

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



## **TESIS DOCTORAL**

Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la  
aplicación de lodos de depuradora urbana

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Clarissa Gondim Porto**

Director

**Federico Navarro García**

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**



**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE UN SUELO AGRÍCOLA  
MEDITERRÁNEO TRAS LA APLICACIÓN DE LODOS DE  
DEPURADORA URBANA**

**Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor por  
DÑA. CLARISSA GONDIM PORTO**

**DIRECTOR:  
DR. FEDERICO NAVARRO GARCÍA**



**D<sup>a</sup>. CONCHA GIL, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICA:** Que Dña. Clarissa Gondim Porto ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid dentro del Programa de Doctorado de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia bajo la dirección del Dr. Federico Navarro García, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense con el título:

“Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana”.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid a 26 junio de 2012.

Fdo. Prof. Dra. D<sup>a</sup>. Concha Gil



**ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO POSIBLE GRACIAS A LA SIGUIENTES AYUDAS:**

- Beca del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación - Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC-AECID) 2008 – 2012.
- Concesión de la beca del pago de matrícula del curso 2007 – 2008 por la Universidad Complutense de Madrid.

**EL TRABAJO DESCRITO HA SIDO FINANCIADO POR LOS PROYECTOS:**

- CGL2006-13915/CLI, 2006-2009, Ministerio de Ciencia e Innovación, “Impacto sobre el cambio climático de la aplicación de lodos de depuradora urbana al suelo. Efectos en el secuestro de carbono”.
- MMA022/PC08/3-04.2, 2009-2012, Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino, “Metodologías para la monitorización de la aplicación de lodos de depuradora. Bioseguridad microbiana y modelos de flujo y transporte de contaminantes solubles”.



*A mi familia.*

*A mi esposo Carlos.*

*A mi inolvidable Tio Zil y a mi primo André Luis que no pudieron ver esta Tesis lista.*





Después de lograr terminar la tesis doctoral, solo puedo agradecer a todas las personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado y que han hecho parte de su realización contribuyendo de una forma u otra para que esta fase llegara a su fin.

Primero antes que nada, doy gracias a mi Dios por saber y sentir que Él estuvo presente principalmente en los momentos más difíciles, y en los momentos de alegría. Muchas gracias por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente cada día de mi vida.

Agradezco inmensamente a mi tutor Prof. Dr. Federico Navarro-García por haberme transmitido todos sus conocimientos con amabilidad, confianza y paciencia, te admiro mucho por tu gran capacidad intelectual. Muchas gracias por haberme concedido tu tiempo y tu esfuerzo siempre diciéndome las cosas con sinceridad y por nunca dejarme desistir de mi sueño: terminar la Tesis Doctoral. Fede, muchas gracias por la confianza que has depositado en mí, por la gran oportunidad que me has proporcionado y por darme ese apoyo constante en estos casi cinco años que estuve en España, al igual que tu bella familia: Marta, Inés y Arturo que me acogió tan bien. Siempre os llevaré en mi corazón.

Quisiera agradecer al Profesor Miguel Ángel por los conocimientos transmitidos, por tu estrecha colaboración, por tu inmensa ayuda, por tu tranquilidad, serenidad y alegría, por tu apoyo en toda mi estancia aquí en España, al igual agradezco a tu linda familia. Siempre llegabas a mí con palabras de ánimo diciéndome que al final todo saldría muy bien. Te admiro mucho por tu fuerza y alegría permanente.

Agradezco a todos los profesores del departamento de Microbiología II, en especial los profesores y profesoras Concha Gil, María Molina, Humberto, Víctor, Jesús, José Manuel, Lucía, Gloria, Angelines, Conchita, Carmina, Rebeca que me acogieron tan bien desde mi llegada a España. Agradezco en especial al Profesor Rafael Rotger que con mucha amabilidad contestaba mis correos desde Brasil y que me encaminó al laboratorio de mi tutor Federico Navarro-García, siempre estaré agradecida por lo que has hecho por mí. Muchas gracias especialmente a la Profesora Carmen de la Rosa por el cariño, por la ayuda y por haberme permitido compartir contigo las prácticas de Microbiología Ambiental. Muchas gracias al Profesor José Antonio por la ayuda con los RDAs y por las divertidas salidas al campo. Muchas gracias también a todos los profesores del Departamento de Edafología, especialmente a Maite que siempre me ha tratado con tanto cariño.

*Muito obrigada a todos meus queridos e inesquecíveis Professores do meu país Brasil, tanto da Universidade de Fortaleza como da Universidade Federal do Ceará, em especial a Vânia, Cristina, Romélia, Renato, Paulo Germano, Arlândia por haver transmitido vossos conhecimentos com toda paciência! Muito obrigada pela confiança depositada em mim durante todos esses anos do curso de Farmácia e da especialização em Hematologia Clínica e pelas cartas de recomendações que me enviaram para que pudesse conseguir a bolsa de estudos! Em especial, agradeço enormemente ao meu querido Professor Everardo que me encaminhou a Madri para fazer o doutorado me ajudando com os contatos, a quem deveria escrever e dando excelentes recomendações minhas aos outros professores. Nunca me esquecerei dessa grande ajuda! Não posso esquecer-me de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram no estágio realizado no Laboratório Central do Ceará (Lacen), em especial a minha mãe Maria Lúcia Gondim Porto (obrigada mamãe por me mostrar como é linda a nossa profissão. Você é a minha inspiração, te amo muito!), a Creuza e Iracema pelos conhecimentos transmitidos, pelo carinho e paciência sempre!*

Muchas gracias a mis queridos amigos y compañeros de trabajo Leti y Nacho que siempre me apoyaron, ayudándome en diversos experimentos (nunca olvidaré las siembras, al final terminábamos riéndonos de todo), por compartir conocimientos y también momentos alegres y tristes. Muchas gracias por las risas (Leti, nunca olvidaré tus sonrisas que alegraban el día a todo el mundo), las bromas, los *cafezinhos* de todas las mañanas (el mejor momento) y por hacer mi estancia en España agradable y feliz. Nunca olvidare de nuestros momentos en la U7. Los quiero mucho, les deseo todo de lo mejor en la vida, ¡siempre os llevaré en mi corazón! No podría dejar de agradecer a mi querido compañero Álvaro Barnuevo ("Menino") de cuando todo empezó, muchas

gracias por tu apoyo en los experimentos, por tus bromas, tus risas y por las correcciones de español, cada día aprendía una palabra nueva contigo amigo. Muchas gracias también a Sara Gómez y a Pilar López por haber empezado con el proyecto, iniciando los experimentos. Muchas gracias a todos en el Departamento de Edafología, especialmente a José Ramón por ayudarnos tanto con mucha paciencia en los análisis estadísticos y en los problemas con los RDAs, y a los amigos y compañeros de trabajo Sergio, Nacho y Cris, gracias por la ayuda.

Muchas gracias a toda la gente del Departamento sin ninguna excepción por haberme acogido tan bien, en especial a mis queridas amigas Tere, Caro, Andrea, Carmen y Claudia por vuestra alegría, sinceridad y apoyo permanente desde el primer día que llegue al Departamento. ¡Muchas gracias por los sentimientos compartidos y por vuestra amistad! No podría dejar de agradecer la ayuda, las sonrisas de cada día, los cafés a los compañeros más que especiales del Departamento de Microbiología II: José Antonio, Vital, Ana, Aída, Dani, Inês, Elvira (U2), Isa, Mari, Pablo, Almudena, Esme, María Oliver, Eugenia, Elvira (U4), Belén, Patri, Noelia, Kike, Raúl, Sonia (¡perdón si se me olvida a alguien!). Mis sinceros agradecimientos a Benito, José Alberto y Elena, puesto que sin vuestra ayuda nadie en el laboratorio podría llevar a cabo los experimentos.

*Sou eternamente agradecida a minha querida e amada família, principalmente aos meus pais: Ruperto e Lúcia que sempre acreditaram em mim apoiando-me, amando-me incondicionalmente, suportando sempre os meus choros e nunca deixando que desistisse do meu sonho, obrigada por suportar a minha ausência durante todos esses quase cinco anos. Espero um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim! Tudo que sou hoje devo a vocês! Se não fossem vocês, eu não estaria terminando essa tese de doutorado. Papai e mamãe, essa vitória é nossa! Amo vocês demais e incondicionalmente! Muito obrigada as minhas irmãs queridas e melhores amigas Lia e Kayve, e ao meu sobrinho e afilhado Luis Eduardo que sempre estiveram presentes nesse caminho duro de pedras, sempre com palavras de alento, amor e carinho todos os dias! Peço perdão por minha ausência durante tanto tempo, amo vocês demais! Muito obrigada também a toda minha família, especialmente as minhas avós queridas, aos meus padrinhos queridos Tia Gracinha e Tio Abdias, a todos meus tios e tias, aos meus cunhados Paulo Eduardo e David, e a todas minhas primas irmãs e melhores amigas Isabele, Betinha, Aninha, Lara, Lilia, Tati, sem nenhuma exceção! Amo todos vocês!*

Muchas gracias al amor de mi vida Carlos Gustavo, fuiste mi mejor regalo. Muchas gracias por ser mi amor y mi mejor amigo, por la confianza que has depositado en mí, por compartir conmigo los buenos y sobre todo, los malos momentos aguantando mis nervios y llantos. Gracias mi amor, por tu tranquilidad, paciencia, apoyo constante, por hacerme mejor persona y por saber lo importante que es para mí este esfuerzo y por esforzarte conmigo. Perdóname por haber estado tanto tiempo lejos y espero un día poder retribuir todo lo que has hecho por mí y hacerte feliz tal como tú me haces. Te amo mucho y siempre. Muchas gracias por el apoyo, cariño y confianza a mi segunda familia: mi suegra Sylvia, mi cuñado Cesar y las Omis Hilde y Elvira.

*Muito obrigada a minha família aqui em Madri, os queridos primos Mateus, Verónica, Zuleica e mis primos-sobrinhos Cecília e Téó, por vosso apoio desde o primeiro dia que cheguei à Espanha, pelas alegrias compartilhadas e comidas, jantas e merendas deliciosas! Muito obrigada por ter me acolhido tão bem! Amo muito vocês!*

*Muito obrigada ao apoio de longe através de emails, ligações e mensagens das minhas melhores amigas de toda a vida: Sabrina, Aracélia, Eveline, Evinha e Viviane. Espero que a nossa amizade dure para sempre!*

Muchas gracias al colegio Nuestra Señora de Guadalupe que me acogió tan bien durante tres años, en especial a la jefa de estudios Paloma Belloso, a toda la gente del colegio y mis inolvidables amigas y amigos sin excepción, especialmente a Leti, Gloria, Yanin, Shelene, Aziza, Silmara y Inés. Gracias por las risas, la amistad y confianza en todo este tiempo.

## RESUMEN



## Resumen

Los lodos de depuradora son los residuos sólidos obtenidos del tratamiento de las aguas residuales. Para el reciclaje de estos productos, el II Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR 2007-2015) exige que se lleve a cabo un tratamiento previo para concentrar la fase sólida y eliminar posibles agentes patógenos. En España, el 65% del total de estos lodos es utilizado como enmienda agrícola, aunque su uso puede entrañar posibles riesgos para el ser humano y el medio ambiente que no han sido suficientemente evaluados. Por esa razón, hemos analizado su efecto en la microbiología de un suelo agrícola mediterráneo utilizando distintas dosis (40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup>) y tipos (anaerobio y aerobio) mediante técnicas dependientes de cultivo y moleculares. Desde el punto de vista sanitario, nuestros resultados muestran que las dosis bajas e intermedias producen un incremento transitorio del número de bacterias patógenas y de resistentes a ampicilina que disminuye hasta niveles similares a los del suelo control o desaparecen al cabo de dos años. Por el contrario, las dosis altas provocan que los valores de esos microorganismos sean superiores a los del suelo control hasta el final del experimento. Desde el punto de vista ambiental, se produce un fenómeno peculiar en el que a pesar de que el número de microorganismos copiotróficos y heterotróficos aumenta en los suelos enmendados con las dosis más altas de lodos, su respiración y biomasa disminuye. En cambio, los suelos enmendados con dosis bajas e intermedias presentan mayores tasas de respiración con el consiguiente incremento en la emisión de CO<sub>2</sub>, gas que produce el efecto invernadero e influye en el llamado cambio climático. Por otro lado, se produce una gran modificación de las poblaciones bacterianas que componen el suelo agrícola tras la adición de lodos que ha podido ser medida mediante técnicas moleculares. Así, los filos bacterianos más afectados corresponden a *Acidobacteria* y *Proteobacteria*, que junto a *Actinobacteria* son los más abundantes en el suelo control. El incremento de bacterias de la clase *Gammaproteobacteria* junto con la disminución de la proporción de las de la clase *Gp6* del filo *Acidobacteria*, constituyen los principales marcadores de la alteración del suelo por la adición de lodos de depuradora a largo plazo. A corto plazo se ha encontrado un incremento de la presencia de diversas bacterias del filo *Firmicutes* (*Bacilli*) que puede ser utilizado como indicador de una contaminación reciente. En las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias las principales modificaciones se detectan en los primeros muestreos y van desapareciendo gradualmente hasta asemejarse a la del suelo control dos años después de la aplicación, fenómeno que no sucede en las parcelas con mayores dosis (sobre todo ANAE160). Podemos concluir, por tanto, que la aplicación de lodos de depuradora en suelos agrícolas precisa todavía de ser evaluada en profundidad puesto que se producen importantes alteraciones sanitarias y ambientales que pueden influir negativamente en la salud del ser humano e influir en el cambio climático.

## Summary

Sewage sludge (or biosolids) is the solid organic matter obtained from urban wastewater treatments. In Spain, the II National Sludge Management Program (PNIR 2007-2015) regulates the production and conditioning of these products for recycling. 65% of the national production of biosolids is recycled as agricultural amendments; however, their use may involve environmental and human health risks. The objective of this work is the analysis of the health and environmental effects on a crop soil of three doses (40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup>) of two different types of biosolids (aerobic and anaerobic) under Mediterranean conditions. From the human health point of view, low and intermediate doses of both types of biosolids produced a transient increase in pathogen and ampicillin-resistant bacteria counts that lowered to levels found in control soil two years after the amendment, which persisted when high doses were used. On the contrary, when high doses were used this increase was higher and persisted after two years. The environmental analysis unveiled an intriguing phenomenon where higher doses increased the number of oligotrophic and heterotrophic counts while decreased soil biomass and respiration. Thus, lower amounts of biosolids increased the amount of CO<sub>2</sub> and therefore their impact on climatic change. Besides these physiologic effects, the composition of bacterial populations in crop soil (composed mainly by species from the phyla *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*) dramatically changed after treatment. The presence of bacteria from the *Gp6* class (*Acidobacteria*) decreased and *Gammaproteobacteria* raised in plots treated with higher doses of biosolids through the whole experiment. In contrast, in plots amended with lower and intermediate doses the bacterial composition became similar to crop soil after two years, being members of the *Bacillus* class a marker of early soil alteration. Using these molecular methods, we have identified several specific OTUs which could serve as candidates to be included in microarrays to perform fast and simple analysis to detect the level of modification of soil bacterial composition. As a conclusion, we suggest that deeper tests in biosolid and soil after amendments should be performed in order to detect possible effects in human and environmental health.

## ÍNDICES





# ÍNDICE

<b>1. EL SUELO Y LOS LODOS DE DEPURADORA.....</b>	<b>7</b>
1.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SUELO. ....	9
1.2 LA DIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO. ....	10
1.2.1 BACTERIAS. ....	11
1.2.2 HONGOS. ....	14
1.2.3 OTROS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SUELO.....	15
1.3 VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DEL SUELO.....	16
1.4 LOS LODOS DE DEPURADORA COMO ENMIENDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS.....	18
1.4.1 ¿LOS LODOS DE DEPURADORA PUEDEN INTRODUCIR MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS? .....	21
<b>2. EFECTOS A LARGO PLAZO EN LAS PROPIEDADES MICROBIANAS DE UN SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO TRAS LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA URBANA.....</b>	<b>25</b>
2.1 RESUMEN.....	27
2.2 INTRODUCCIÓN .....	29
2.3 OBJETIVOS .....	31
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
2.4.1 LOCALIZACIÓN DE LAS PARCELAS. ....	32
2.4.2 PREPARACIÓN DE PARCELAS DE ENSAYO.....	33
2.4.3 RECOGIDA DE MUESTRAS.....	34
2.4.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE SIEMBRAS. ....	36
2.4.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS.....	39
2.4.6 MICROORGANISMOS TOTALES (OLIGOTRÓFICOS Y COPIOTRÓFICOS), HONGOS Y BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA. ....	40
2.4.7 PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DE LA BIOMASA Y RESPIRACIÓN MICROBIANA.....	40
2.4.8 ANÁLISIS DE LOS DATOS. ....	43
2.5 RESULTADOS.....	44
2.5.1 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN MICROBIANA DE LAS PARCELAS DEL ESTUDIO.....	44
2.5.2 EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS ANALIZADOS.....	56
2.5.3 INFLUENCIA DE LOS LODOS DE DEPURADORA EN LA MICROBIOTA DE BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA DE LOS SUELOS. ....	63
2.5.4 CORRELACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS, ACTIVIDADES MICROBIANAS Y PARÁMETROS AMBIENTALES. ....	70
2.5.5 INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES EN LAS PROPIEDADES MICROBIANAS ANALIZADAS. ....	73
2.6 DISCUSIÓN .....	86
2.6.1 ALTERACIONES GENERALES DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL SUELO TRAS LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA.....	86
2.6.2 ¿SE TRANSMITEN Y MANTIENEN DETERMINADOS PATÓGENOS ENTÉRICOS EN LOS SUELOS TRAS LA ADICIÓN DE LODOS?.....	92
2.6.3 LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA INCREMENTA EL NÚMERO Y LA PROPORCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA EN EL SUELO AGRÍCOLA. ..	95
2.6.4 ¿ES AMBIENTAL Y SANITARIAMENTE SEGURO UTILIZAR LODOS DE DEPURADORA URBANA COMO ENMIENDA AGRÍCOLA?.....	98
2.7 CONCLUSIONES.....	100
<b>3. LA ADICIÓN DE LODOS DE DEPURADORA MODIFICA LA ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DURANTE UN LARGO PERIODO DE TIEMPO.....</b>	<b>101</b>
3.1 RESUMEN.....	103
3.2 INTRODUCCIÓN .....	105
3.3 OBJETIVOS .....	107
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	108
3.4.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE SUELO.....	108

3.4.2	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA. ....	112
3.4.3	ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE LAS MUESTRAS.....	112
3.4.4	ANÁLISIS DE LOS DATOS. ....	114
3.5	RESULTADOS.....	115
3.5.1	ANÁLISIS MOLECULAR DE LA COMPOSICIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS CARACTERÍSTICAS EN UN SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO. ....	115
3.5.2	ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS PRESENTES EN LOS Lodos UTILIZADOS EN EL ENSAYO.....	125
3.5.3	EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS EN EL SUELO A LO LARGO DEL ENSAYO.....	129
3.5.4	ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO. ....	197
3.5.5	INFLUENCIA DE LAS VARIABLES AMBIENTALES EN LA COMPOSICIÓN BACTERIANA CARACTERÍSTICA DE CADA MUESTRA.....	202
3.6	DISCUSIÓN .....	206
3.6.1	POBLACIONES BACTERIANAS CARACTERÍSTICAS EN UN SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO. ....	206
3.6.2	MODIFICACIONES DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS POR EL USO DE Lodos DE DEPURADORA EN SUELOS AGRÍCOLAS MEDITERRÁNEOS.....	209
3.7	CONCLUSIONES.....	219
4.	REFLEXIÓN FINAL. ....	221
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	227

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. FILOS MÁS COMUNES DEL SUELO.....	12
FIGURA 2. ESQUEMA DEL TRATAMIENTO DE LODOS DE DEPURADORA DE AGUAS RESIDUALES.....	20
FIGURA 3. PRÁCTICAS DE GESTIÓN DEL SUELO Y FLUJO GENÉTICO.....	23
FIGURA 4. LOCALIZACIÓN DE LAS PARCELAS.....	32
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA DISTRIBUCIÓN ALEATORIZADA DE LOS LODOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS.....	34
FIGURA 6. TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN EN LAS PARCELAS DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO.....	35
FIGURA 7. PORCENTAJE DE HUMEDAD EN LOS DISTINTOS MUESTREOS DEL ESTUDIO.....	36
FIGURA 8. ESQUEMA DE LA DETERMINACIÓN DE CO <sub>2</sub> EN UN POCILLO DEL SISTEMA <i>MICRORESP</i> <sup>TM</sup> .....	41
FIGURA 9. BIOMASA MICROBIANA (SIR) DE MUESTRAS DE LAS PARCELAS DEL ESTUDIO.....	45
FIGURA 10. RESPIRACIÓN EN LAS PARCELAS DEL ESTUDIO.....	46
FIGURA 11. MICROORGANISMOS OLIGOTRÓFICOS.....	51
FIGURA 12. MICROORGANISMOS OLIGOTRÓFICOS.....	52
FIGURA 13. MICROORGANISMOS COPIOTRÓFICOS.....	53
FIGURA 14. BACTERIAS OLIGOTRÓFICAS.....	54
FIGURA 15. HONGOS.....	55
FIGURA 16. PATÓGENOS ENTÉRICOS DETECTADOS EN LOS LODOS DE DEPURADORA APLICADOS A LAS PARCELAS DEL ESTUDIO.....	56
FIGURA 17. COLIFORMES FECALES.....	60
FIGURA 18. ENTEROCOCOS.....	61
FIGURA 19. CLOSTRIDIOS SULFITOREDUCTORES.....	62
FIGURA 20. BACTERIAS RESISTENTES A 32 µG ML <sup>-1</sup> DE AMPICILINA.....	65
FIGURA 21. BACTERIAS RESISTENTES A 64 µG ML <sup>-1</sup> DE AMPICILINA.....	66
FIGURA 22. BACTERIAS RESISTENTES A 1 G L <sup>-1</sup> DE AMPICILINA.....	67
FIGURA 23. PORCENTAJE DE BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA (32 µG ML <sup>-1</sup> Y 64 µG ML <sup>-1</sup> ).....	68
FIGURA 24. PORCENTAJE DE BACTERIAS RESISTENTES A 1 G L <sup>-1</sup> DE AMPICILINA.....	69
FIGURA 25. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE SU BIOMASA, RESPIRACIÓN Y HUMEDAD.....	74
FIGURA 26. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LAS POBLACIONES DE OLIGOTRÓFICOS Y COPIOTRÓFICOS ANALIZADOS.....	75
FIGURA 27. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN RDA DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LAS POBLACIONES DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.....	77
FIGURA 28. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN RDA DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LAS POBLACIONES DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A AMPICILINA (MUESTREOS: T3, T4, T5 Y T6).....	78
FIGURA 29. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN RDA DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LA BIOMASA, LA RESPIRACIÓN Y LA HUMEDAD UTILIZANDO VARIABLES AMBIENTALES ADICIONALES (EDAFOLOGÍA).....	80
FIGURA 30. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN RDA DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LAS POBLACIONES DE OLIGOTRÓFICOS Y COPIOTRÓFICOS ANALIZADAS UTILIZANDO VARIABLES AMBIENTALES ADICIONALES (EDAFOLOGÍA). ANÁLISIS REALIZADO PARA LOS MUESTREOS DE JUNIO DE 2007, 2008 Y 2009 (T0, T3 Y T6).....	81
FIGURA 31. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN RDA DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LAS POBLACIONES DE LAS POBLACIONES DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS UTILIZANDO VARIABLES AMBIENTALES ADICIONALES (EDAFOLOGÍA).....	82
FIGURA 32. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN RDA DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LA BIOMASA, LA RESPIRACIÓN, LA HUMEDAD Y LOS TIPOS DE MICROORGANISMOS ANALIZADOS UTILIZANDO VARIABLES AMBIENTALES ADICIONALES (EDAFOLOGÍA).....	83
FIGURA 33. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA CONTROL - <i>SOIL</i> .....	116
FIGURA 34. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUs PRESENTES EN CADA MUESTRA DE SUELO CONTROL EN LOS DISTINTOS MUESTREOS.....	118
FIGURA 35. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LOS LODOS DE DEPURADORA AEROBIO Y ANAEROBIO.....	126
FIGURA 36. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUs PRESENTES EN LODO AEROBIO Y ANAEROBIO.....	127
FIGURA 37. CURVAS DE RAREFACCIÓN DE LOS LODOS AEROBIO Y ANAEROBIO.....	128
FIGURA 38. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA DE SUELO TRATADA CON 40 T HA <sup>-1</sup> DE LODO AEROBIO.....	130
FIGURA 39. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUs PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS EN AE40.....	131

FIGURA 40. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA DE SUELO TRATADA CON 80 T HA <sup>-1</sup> DE LODO AEROBIO. ....	132
FIGURA 41. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS EN AE80. ....	134
FIGURA 42. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA DE SUELO TRATADA CON 160 T HA <sup>-1</sup> DE LODO AEROBIO. ....	135
FIGURA 43. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS EN AE160. ....	137
FIGURA 44. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA DE SUELO TRATADA CON 40 T HA <sup>-1</sup> DE LODO ANAEROBIO. ....	138
FIGURA 45. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA DE SUELO TRATADA CON 80 T HA <sup>-1</sup> DE LODO ANAEROBIO. ....	139
FIGURA 46. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS EN ANAE40. ....	141
FIGURA 47. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS EN ANAE80. ....	142
FIGURA 48. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA PARCELA DE SUELO TRATADA CON 160 T HA <sup>-1</sup> DE LODO ANAEROBIO. ....	143
FIGURA 49. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS EN ANAE160. ....	144
FIGURA 50. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA INCLUYENDO LOS LODOS EN LOS DISTINTOS MUESTREOS Y OTUS EN CADA MUESTRA EN EL PRIMER ANÁLISIS (JUNIO DE 2007, T0) Y EN LOS LODOS. ....	146
FIGURA 51. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN JUNIO DE 2007 (T0). ....	148
FIGURA 52. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN JUNIO DE 2007 (T0). ....	149
FIGURA 53. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN OCTUBRE DE 2007 (T1). ....	151
FIGURA 54. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN OCTUBRE DE 2007 (T1). ....	152
FIGURA 55. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN FEBRERO DE 2008 (T2). ....	153
FIGURA 56. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN FEBRERO DE 2008 (T2). ....	154
FIGURA 57. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN JUNIO DE 2008 (T3). ....	156
FIGURA 58. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN JUNIO DE 2008 (T3). ....	157
FIGURA 59. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN OCTUBRE DE 2008 (T4). ....	158
FIGURA 60. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN OCTUBRE DE 2008 (T4). ....	159
FIGURA 61. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN FEBRERO DE 2009 (T5). ....	160
FIGURA 62. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN FEBRERO DE 2009 (T5). ....	161
FIGURA 63. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN TODAS LAS MUESTRAS EN JUNIO DE 2009 (T6). ....	162
FIGURA 64. COMPARACIONES ENTRE LOS OTUS PRESENTES EN CADA MUESTRA EN JUNIO DE 2009 (T6). ....	163
FIGURA 65. COMPARACIONES ENTRE LAS CLASES PRESENTES EN TODOS LOS MUESTREOS AGRUPADOS POR MUESTRAS. ....	183
FIGURA 66. COMPARACIONES ENTRE LAS CLASES PRESENTES EN TODAS LAS PARCELAS AGRUPADAS POR MUESTREO. ....	187
FIGURA 67. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO RESPECTO A LAS CLASES BACTERIANAS MÁS ABUNDANTES PRESENTES EN ELLAS. ....	189
FIGURA 68. CURVAS DE RAREFACCIÓN DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO POR CADA MUESTREO. ....	201
FIGURA 69. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LAS CLASES BACTERIANAS MÁS ABUNDANTES EN CADA MUESTRA EN FUNCIÓN DE SU BIOMASA, PRECIPITACIÓN DE LOS 3 DÍAS, DOSIS Y TRATAMIENTO DE LODO UTILIZADO. ....	203
FIGURA 70. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LAS CLASES BACTERIANAS MÁS ABUNDANTES EN CADA MUESTRA EN FUNCIÓN SU BIOMASA, RESPIRACIÓN Y HUMEDAD, Y UTILIZANDO VARIABLES AMBIENTALES ADICIONALES (DATOS CEDIDOS POR EDAFOLOGÍA). ....	205
FIGURA 71. RELACIÓN ENTRE <i>PROTEOBACTERIA:ACIDOBACTERIA</i> DE LAS MUESTRAS. ....	214

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TEXTURA DEL SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO ANALIZADO.....	33
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS LODOS DE LAS DEPURADORAS. ....	33
TABLA 3. PARCELAS QUE FUERON ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO. ....	34
TABLA 4. FECHAS Y ESTACIONES DEL AÑO DE LOS MUESTREOS. ....	35
TABLA 5. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.....	38
TABLA 6. MICROORGANISMOS OLIGOTRÓFICOS (R2A). ....	47
TABLA 7. MICROORGANISMOS OLIGOTRÓFICOS (ETD).....	48
TABLA 8. MICROORGANISMOS COPIOTRÓFICOS (AGAR ACTINOMICETOS). ....	49
TABLA 9. BACTERIAS OLIGOTRÓFICAS (R2AC). ....	49
TABLA 10. HONGOS (SABOURAUD CLORANFENICOL). ....	50
TABLA 11. COLIFORMES FECALIS (TTC).....	57
TABLA 12. ENTEROCOCOS (BILIS ESCULINA). ....	58
TABLA 13. CLOSTRIDIOS SULFITOREDUCTORES (HIERRO SULFITO). ....	58
TABLA 14. BACTERIAS RESISTENTES A 32 µG ML <sup>-1</sup> DE AMPICILINA. ....	63
TABLA 15. BACTERIAS RESISTENTES A 64 µG ML <sup>-1</sup> DE AMPICILINA. ....	64
TABLA 16. BACTERIAS RESISTENTES A 1 G L <sup>-1</sup> DE AMPICILINA.....	64
TABLA 17. CORRELACIONES ENTRE LOS TIPOS DE MICROORGANISMOS Y LA BIOMASA, RESPIRACIÓN Y HUMEDAD EN TODOS LOS MUESTREOS DEL ESTUDIO.....	71
TABLA 18. CORRELACIONES ENTRE LOS TIPOS DE MICROORGANISMOS Y LA BIOMASA, RESPIRACIÓN Y HUMEDAD EN TODOS LOS MUESTREOS DEL ESTUDIO, SIN LOS DATOS DE AE160 Y ANAE160. ....	72
TABLA 19. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUELO Y DEL TRATAMIENTO APLICADO EN LAS POBLACIONES Y ACTIVIDADES MICROBIANAS DE LOS SUELOS ANALIZADOS.....	84
TABLA 20. ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD Y SUS RESPECTIVAS FÓRMULAS. ....	113
TABLA 21. DIRECCIONES DE LAS PÁGINAS EN INTERNET DE LOS PROGRAMAS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS. .....	114
TABLA 22. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DEL SUELO CONTROL EN JUNIO DE 2007 (T0) Y EL RESTO DE LOS MUESTREOS. ....	119
TABLA 23. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DEL SUELO CONTROL EN OCTUBRE DE 2007 (T1) Y EL RESTO DE LOS MUESTREOS. ....	121
TABLA 24. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DEL SUELO CONTROL EN FEBRERO DE 2008 (T2) Y EL RESTO DE LOS MUESTREOS. ....	122
TABLA 25. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DEL SUELO CONTROL EN JUNIO DE 2008 (T3) Y EL RESTO DE LOS MUESTREOS. ....	124
TABLA 26. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DEL SUELO CONTROL EN OCTUBRE DE 2008 (T4) Y EL RESTO DE LOS MUESTREOS. ....	124
TABLA 27. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DEL SUELO CONTROL EN FEBRERO DE 2009 (T5) Y JUNIO DE 2009 (T6). ....	124
TABLA 28. DIFERENCIAS ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS CARACTERÍSTICAS EN EL SUELO CONTROL EN T5 COMPARADA CON EL RESTO DE LOS MUESTREOS. ....	125
TABLA 29. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DE SOIL Y LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO AEROBIO Y ANAEROBIO. ....	168
TABLA 30. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DE AE40 Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO AEROBIO Y ANAEROBIO. ....	170
TABLA 31. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DE AE80 Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO AEROBIO Y ANAEROBIO. ....	171
TABLA 32. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DE AE160 Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO ANAEROBIO. ....	172
TABLA 33. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DE ANAE40 Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO ANAEROBIO. ....	173
TABLA 34. COMPARACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MÁS ABUNDANTES DE ANAE80 Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO ANAEROBIO. ....	174
TABLA 35. COMPARACIONES ENTRE LOS FILOS BACTERIANOS MENOS ABUNDANTES Y RAROS DE SOIL Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO AEROBIO Y ANAEROBIO. ....	176

TABLA 36. COMPARACIONES ENTRE LOS FILOS BACTERIANOS MENOS ABUNDANTES Y RAROS DE <b>AE40</b> Y EL RESTO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO AEROBIO Y ANAEROBIO. ....	177
TABLA 37. COMPARACIONES ENTRE LOS FILOS BACTERIANOS MENOS ABUNDANTES Y RAROS DE <b>AE80</b> Y LAS OTRAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO AEROBIO Y ANAEROBIO. ....	178
TABLA 38. COMPARACIONES ENTRE LOS FILOS BACTERIANOS MENOS ABUNDANTES Y RAROS DE <b>AE160</b> Y LAS MUESTRAS TRATADAS CON LODO ANAEROBIO. ....	178
TABLA 39. OTUS CARACTERÍSTICOS DEL SUELO CONTROL ( <i>Soil</i> ) EN CADA MUESTREO. ....	190
TABLA 40. OTUS CARACTERÍSTICOS DE <b>AE40</b> EN CADA MUESTREO. ....	191
TABLA 41. OTUS CARACTERÍSTICOS DE <b>AE80</b> EN CADA MUESTREO. ....	192
TABLA 42. OTUS CARACTERÍSTICOS DE <b>AE160</b> EN CADA MUESTREO. ....	192
TABLA 43. OTUS CARACTERÍSTICOS DE <b>ANAE40</b> EN CADA MUESTREO. ....	193
TABLA 44. OTUS CARACTERÍSTICOS DE <b>ANAE80</b> EN CADA MUESTREO. ....	194
TABLA 45. OTUS CARACTERÍSTICOS DE <b>ANAE160</b> EN CADA MUESTREO. ....	194
TABLA 46. OTUS EXCLUSIVOS DE CADA MUESTRA DEL ESTUDIO. ....	195
TABLA 47. OTUS MÁS ABUNDANTES Y CARACTERÍSTICOS EN TODAS LAS MUESTRAS. ....	196
TABLA 48. ÍNDICES DE DIVERSIDAD DE LAS MUESTRAS EN CADA ANÁLISIS ( <b>T0</b> HASTA <b>T6</b> ). ....	197
TABLA 49. RELACIÓN <i>PROTEOBACTERIA:ACIDOBACTERIA</i> TOTAL DE LAS MUESTRAS. ....	214

## **CAPÍTULO I**

### **1. El suelo y los lodos de depuradora.**





El suelo se encuentra en la superficie de la Tierra y es la interfase entre la atmósfera y la litosfera. Es un medio muy complejo que contiene una biodiversidad muy extensa y es esencial para la vida porque mantiene el crecimiento de muchos animales y plantas, proporcionando además alimentos, combustible y fibra al ser humano (Lavelle y Spain, 2003; Young y Crawford, 2004; White, 2006; Blanco y Lal, 2010). Varios factores como el relieve, el clima, los organismos presentes y el tiempo intervienen en su formación (Buscot, 2005).

La complejidad del suelo se debe principalmente a dos componentes: su arquitectura y su diversidad biótica, que es mantenida por grandes cantidades de energía obtenida mediante la fotosíntesis (Maier *et al.*, 2009).

## **1.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SUELO.**

---

La arquitectura del suelo está constituida por componentes sólidos, líquidos y gaseosos. Los componentes sólidos son orgánicos e inorgánicos que se encuentran en diversos estados de descomposición y desintegración. Los elementos orgánicos se originan básicamente a partir de restos de animales y plantas (Jhonson, 2009). La fase líquida, o solución del suelo, es una matriz constituida por una solución acuosa de solutos orgánicos e inorgánicos cuya composición es extremadamente importante para la actividad biológica puesto que muchos microorganismos requieren altos niveles de agua en el suelo para vivir (Maier *et al.*, 2009). La fase gaseosa está formada por nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y metano, entre otros gases, que se encuentran en los espacios entre partículas, donde no hay agua. La cantidad de gases en el suelo es inversamente proporcional a la cantidad de agua presente (Conklin, 2005). Se ha descrito que un suelo ideal para cultivos agrícolas debería tener un contenido de 45 % de minerales, 5 % de materia orgánica, 25 % de aire y 25 % de agua (Jhonson, 2009).

Los componentes inorgánicos del suelo son principalmente iones derivados del desgaste de los minerales, el carbono elemental formado por la disolución de CO<sub>2</sub> atmosférico para formar ácido carbónico y su posterior precipitación en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y los carbonatos (yeso, calcita, aragonita, dolomita y siderita), los cuales pueden ser litogénicos o primarios y pedogénicos o secundarios (Lal, 2007).

De todos los elementos presentes en el suelo mencionados anteriormente, la materia orgánica es la más importante ya que es responsable de mantener la vida en este ecosistema. Está formada por una fuente primaria de nutrientes esenciales como el nitrógeno, el fósforo y el azufre (Paul, 2007) y por carbono como la combinación de biomasa de microorganismos vivos (animales, microbios y raíces de plantas), materia biológica muerta y en descomposición, y sustancias húmicas (Maier *et al.*, 2009; Sherameti y Varma, 2009). Estas últimas son mezclas heterogéneas de sustancias orgánicas naturales que se forman en el proceso de humificación que consiste en la descomposición de restos de plantas y animales (Nieder y Benbi, 2008).

La materia orgánica (carbono orgánico presente en el suelo) es, además, un parámetro importante para el concepto de salud del suelo. Factores como la capacidad

del suelo de almacenar agua, proporcionar nutrientes, liberar gases, modificar sustancias contaminantes y resistir a degradaciones físicas, se encuentran fuertemente afectados por la calidad y cantidad de materia orgánica presente en el suelo (Rees *et al.*, 2001). Su cantidad va a depender del equilibrio entre la productividad primaria y la descomposición (Paul, 2007). La magnitud y las propiedades de ese carbono orgánico depende de las propiedades del suelo (contenido en arcilla, retención de agua por el suelo, reserva de nutrientes), de las características de los perfiles de los suelos (por ejemplo, suelos con raíces profundas), de las características del terreno (por ejemplo, orientación norte/sur), de la temperatura (más en climas fríos que en climas calientes) y de la precipitación (mayor en regiones húmedas que en regiones secas) (Lal, 2007). El carbono orgánico se encuentra en cantidades significativas tanto en los horizontes superficiales como en los subsuperficiales del suelo. Los primeros se han definido arbitrariamente de 0 a 25 cm de profundidad y los segundos por debajo de esos primeros 25 cm. Aunque las concentraciones de carbono orgánico en los horizontes subsuperficiales son generalmente mucho menores de lo que se encuentra en horizontes superficiales, el volumen total de suelo en los horizontes subsuperficiales es mucho más grande. De esta manera, más del 50 % del contenido de carbono orgánico en perfiles de suelo de hasta un metro de profundidad se encuentra en los horizontes subsuperficiales (Fierer *et al.*, 2003b).

Los agregados complementan la arquitectura del suelo ya que consisten en la unión de diversos tipos de partículas. Estas estructuras se forman mediante diversos factores físicos, químicos y biológicos. Entre estos últimos destacan los polisacáridos y otros metabolitos excretados por los microorganismos, las hifas de los hongos, las micorrizas y las raíces de las plantas (Rillig y Mummey, 2006; Maier *et al.*, 2009). Los agregados en el suelo se clasifican según su tamaño en micro y macroagregados. Los microagregados son partículas con tamaño inferior a 250  $\mu\text{m}$  mientras que los macroagregados son mayores de 250  $\mu\text{m}$  y pueden encontrarse unidos a elementos como hierro, aluminio, polisacáridos y polímeros húmicos (Lavelle y Spain, 2003). La formación de agregados es un factor extremadamente importante para su sostenibilidad y estabilidad porque permite que el suelo resista a la erosión causada por el agua y por el viento. La estabilidad de los agregados se incrementa con el aumento de la cantidad de materia orgánica en el suelo (por ejemplo, mediante la utilización de fertilizantes orgánicos) y con la presencia de las raíces de las plantas (Blanco y Lal, 2010).

Sin embargo, la fuerza más importante que dirige los cambios de la estructura y composición química del suelo es la comunidad microbiana que reside en él, puesto que es la responsable de la transformación de la mayoría de los nutrientes presentes en el suelo (Rousk *et al.*, 2009a).

## **1.2 LA DIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO.**

---

El suelo es un hábitat que generalmente favorece la proliferación de microorganismos que se desarrollan como microcolonias asociadas a partículas de suelo. La cantidad de microorganismos presentes en el suelo es normalmente mucho mayor que la encontrada en ambientes marinos (Atlas y Bartha, 2002).

En la superficie del suelo viven poblaciones de arqueas, bacterias, hongos, algas y protozoos, y su distribución depende de los nutrientes, de la estructura y de la

textura del suelo. Las bacterias y los hongos son los dos grupos más numerosos en el suelo. Estos microorganismos son esenciales para los procesos de los ciclos biogeoquímicos, tienen la capacidad de degradar compuestos contaminantes (principalmente los actinomicetos) y son responsables de la degradación de la materia orgánica presente en el suelo (Atlas y Bartha, 2002; Six *et al.*, 2006; Lal, 2007; Maier *et al.*, 2009; Prosser, 2010). Debido a la enorme diversidad de la microbiota del suelo, hasta la fecha, ha sido imposible identificar todos los microorganismos presentes, pero se ha podido estimar mediante diversas técnicas. Así, se ha estimado que en un suelo orgánico puede haber un total de  $2,6 \times 10^{29}$  células microbianas y entre ellas,  $10^{12}$  bacterias,  $10^4$  protozoos y 25 km de hifas de hongos (Young y Crawford, 2004; Voroney, 2007). Esta gran diversidad de microorganismos es utilizada como un indicador de la calidad del suelo, ya que los microorganismos responden rápidamente a los cambios de las condiciones ambientales en el suelo (Rees *et al.*, 2001).

Lógicamente, al tener una gran diversidad, el suelo tiene que ser por fuerza un nicho complejo y competitivo. Hay una serie de factores que influyen en la actividad de la gran cantidad de microorganismos presentes en el suelo que como consecuencia, tienen que adaptarse al estrés del ambiente. Por ello, las poblaciones microbianas del suelo son dinámicas y sufren un cambio continuo (Lavelle y Spain, 2003). Estos factores pueden ser bióticos (p.ej. la competición con otros microorganismos) o abióticos (las características físicas y químicas del suelo, temperatura, humedad, pH, potencial redox) (Maier *et al.*, 2009). Otros factores como las fuentes de energía y carbono, la presión, la composición iónica y la interacción genética entre microorganismos también son capaces de afectar a la ecología, actividad y la dinámica de las poblaciones de microorganismos en el suelo (Nannipieri *et al.*, 2003).

Los microorganismos presentes en el suelo son factores clave en los ciclos de la mayoría de los nutrientes presentes en la Tierra, especialmente en el ciclo del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. En el caso del ciclo del carbono, son responsables de la descomposición de residuos orgánicos y de la degradación de compuestos orgánicos contaminantes presentes en el suelo, siendo muy frecuente la utilización de cosustratos como las enmiendas orgánicas para su activación (Atlas y Bartha, 2002; Ros *et al.*, 2010). La energía presente en el ecosistema del suelo deriva, entre otros compuestos, de esa descomposición de la materia orgánica por estos microorganismos (Nielsen y Winding, 2002; Pepper y Gerba, 2005). Otra de las funciones importantes de las bacterias es la secreción de sustancias adherentes en forma de polisacáridos que ayudan en la formación de micro y macroagregados que proporcionan estabilidad a la estructura del suelo (Voroney, 2007).

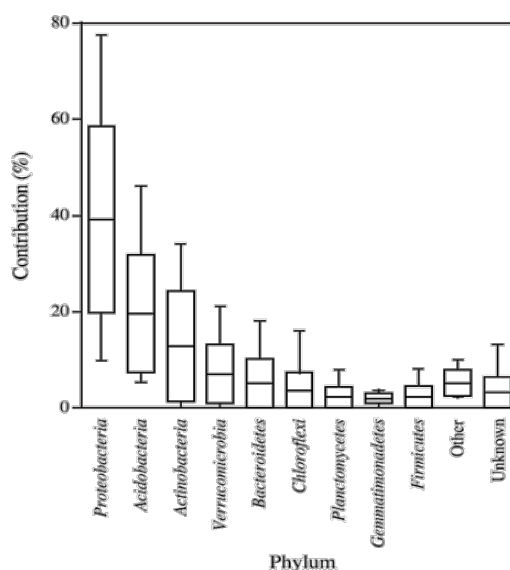
### **1.2.1 BACTERIAS.**

Las bacterias son los microorganismos más numerosos en la superficie del suelo y su cantidad y tipo varía dependiendo de las condiciones ambientales en él, principalmente la temperatura y la humedad (Paul, 2007; Voroney, 2007; Maier *et al.*, 2009). Se estima que la población bacteriana del suelo puede llegar a exceder de las  $10^{10}$  células por gramo de suelo. Estos microorganismos pueden ser cultivables (de

estos se presume que existan de  $10^7$  a  $10^8$  células por gramo de suelo) y no cultivables (Maier *et al.*, 2009).

¿Cuáles y cuántas son las bacterias presentes en el suelo? Esta es una pregunta que los investigadores todavía no saben contestar debido a la enorme variedad de microorganismos que hay en el suelo. Tradicionalmente, las bacterias han sido determinadas utilizando técnicas dependientes de cultivo, aunque no son suficientemente potentes para determinar la composición de las poblaciones de estos microorganismos. Actualmente, la estimación de la diversidad microbiana de muchos ambientes se basa en la combinación de técnicas de secuenciación, análisis bioinformático y estadística. Las técnicas moleculares generalmente comienzan con la extracción de ácidos nucleicos del suelo y posteriormente la amplificación del fragmento 16S por PCR (en el caso de las bacterias) (Nannipieri *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2004). En el caso del suelo, como también en la determinación de la presencia de microorganismos de cualquier ambiente, la diversidad puede ser determinada utilizando el número de OTUs (*Operational Taxonomic Unit*, Unidad Taxonómica Operativa), correspondiendo cada uno de ellos a una población de bacterias diferente en la comunidad microbiana. De esta manera, se facilita la clasificación de estos microorganismos, lo que ha permitido estimar que hay cerca de 6300 OTUs distintos por gramo de suelo agrícola (Maier *et al.*, 2009).

Mediante el análisis genético realizado con secuencias del gen 16S bacteriano, se ha estimado que la mayor parte de la microbiota de varios tipos de suelos está compuesta por bacterias de los filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicutes* (Figura 1) (Janssen, 2006). Dentro de esos filos más comunes, los géneros bacterianos más frecuentemente encontrados son *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Actinomicetes* o *Bacillus*, entre otros. En comparación con ambientes acuáticos hay una gran proporción de bacterias Gram-positivas, aunque en números absolutos predominan las bacterias Gram-negativas en el suelo (Atlas y Bartha, 2002).



**Figura 1. Filos más comunes del suelo.**

Datos publicados por (Janssen, 2006).

Existen otros aspectos, generalmente fisiológicos o metabólicos, que permiten clasificar y distinguir las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo. Uno de estos aspectos es la utilización del oxígeno, las bacterias del suelo pueden ser aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas (Pepper y Gerba, 2005). En la superficie del suelo, las bacterias aerobias están en mayor cantidad que las anaerobias, estimándose que el número de éstas se incrementa con la profundidad del suelo, pero raramente predominan a menos que el suelo esté saturado (Maier *et al.*, 2009).

En cuanto a la utilización de los nutrientes, las bacterias del suelo pueden ser clasificadas en **oligotróficas** y **copiotróficas**. Las primeras necesitan de una pequeña concentración de nutrientes y utilizan lentamente la materia orgánica. Las bacterias copiotróficas, por el contrario, son aquellas que necesitan una gran concentración de nutrientes y se adaptan a intervalos de latencia y rápido crecimiento dependiendo de la disponibilidad de estos sustratos (Atlas y Bartha, 2002; Maier *et al.*, 2009). La presencia de esas bacterias en el suelo va a depender de la disponibilidad de nutrientes en ese ecosistema, aunque la mayoría de los suelos representan un ambiente oligotrófico (Whalen y Sampedro, 2010).

Respecto a la descomposición de sustancias presentes en el suelo, los actinomicetos son muy efectivos en esa actividad. Esas bacterias pertenecientes al filo *Actinobacteria* son capaces de descomponer compuestos presentes en el estiércol, herbicidas o pesticidas que son utilizados en el suelo y de degradar muchas sustancias resistentes como lignina, pectina, queratina, celulosa, hemicelulosa y ácidos húmicos mediante la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas (Prosser *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2009; Whalen y Sampedro, 2010). Son bacterias Gram-positivas filamentosas muy abundantes en el suelo (el 10-33 % del total) que se caracterizan por poseer un micelio parecido al de los hongos pero de menor tamaño, y cuya clasificación está basada en la estructura del aparato vegetativo (micelio) y el patrón de reproducción (por fragmentación, formación de conidios vegetativos o esporangios sexuales) (Lavelle y Spain, 2003; Maier *et al.*, 2009). Los actinomicetos son generalmente resistentes a la desecación y son termotolerantes, pudiendo sobrevivir en suelos desérticos. El pH neutro o alcalino favorece su crecimiento (Atlas y Bartha, 2002; Pepper y Gerba, 2005). De todos los actinomicetos aislados del suelo, el 90 % pertenece al grupo de los estreptomicetos, siendo el más diverso (Killham y Prosser, 2007). En el caso del nitrógeno, nutriente que usualmente es limitante en el medio ambiente, las cianobacterias tienen la capacidad de fijarlo y sus características son muy similares a las de las algas (Maier *et al.*, 2009).

Además de la actividad de las bacterias en procesos generales descritos previamente, estos microorganismos presentan otras características importantes. Una de ellas, relevante para nuestro estudio, es la capacidad de producir antibióticos. La finalidad de la producción de antibióticos presumiblemente es la de competir y señalar su presencia a otros microorganismos del suelo siendo un tipo de estrés biótico (Davies, 2006). Por ejemplo, los actinomicetos pueden producir antibióticos como eritromicina, neomicina, tetraciclina, anfotericina y estreptomina. Las bacterias del género *Bacillus* presentes en el suelo también son capaces de producir antibióticos como la polimixina o bacitracina (Killham y Prosser, 2007). Además, algunos patógenos de plantas y rizobacterias como *Erwinia*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*,

*Chromobacterium* y *Agrobacterium* sp, tienen la capacidad de producir diversos  $\beta$ -lactámicos (Gaze *et al.*, 2008).

### 1.2.2 HONGOS.

Los hongos son microorganismos numerosos en el suelo y se estima que existen entre  $10^5$  y  $10^6$  células por gramo de suelo. Constituyen una gran proporción de la biomasa microbiana del suelo debido a sus micelios, aunque en ciertos ecosistemas tropicales o agrícolas donde existe una gran disponibilidad de materia orgánica, los hongos son menos predominantes en términos de biomasa, diversidad y actividad (Thorn y Lynch, 2007). Los hongos generalmente predominan en suelos ácidos en los cuales monopolizan la utilización de sustratos orgánicos (Buscot y Varma, 2005).

Son microorganismos heterotróficos generalmente aerobios, por lo que dependen del carbono y del nitrógeno exógeno para sobrevivir (Broeckling *et al.*, 2008; Maier *et al.*, 2009). El papel de los hongos en el suelo es extremadamente complejo y estos microorganismos son esenciales y tan importantes como las bacterias en los ciclos del nitrógeno y del carbono (Bridge y Spooner, 2001; Thorn y Lynch, 2007; Whalen y Sampedro, 2010). Además, son responsables de la descomposición de la materia orgánica, sea sencilla (azúcares, por ejemplo) o compleja (polímeros como celulosa y lignina), y también tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos. Los principales grupos de hongos encontrados en el suelo son *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Thorn y Lynch, 2007; Hibbett *et al.*, 2007; McLaughlin *et al.*, 2009). Dentro de estos grupos más comunes, los géneros más frecuentemente encontrados en el suelo son *Penicillium* y *Aspergillus* (Thorn y Lynch, 2007; Voroney, 2007; Maier *et al.*, 2009). Los hongos presentes en el suelo se diferencian entre sí, principalmente, por la estructura de sus micelios, conidióforos y órganos de reproducción (Lavelle y Spain, 2003; Buscot y Varma, 2005).

Estos microorganismos son resistentes a las condiciones abióticas extremas. La baja concentración de nutrientes, los periodos permanentes de sequía, las bajas temperaturas, el pH ácido, cuando existe una elevada relación C:N, o lignina:N, o la presencia de una elevada concentración de fenoles, son algunos ejemplos de esas condiciones abióticas que los hongos generalmente son capaces de soportar (Thorn y Lynch, 2007; Maier *et al.*, 2009). Además, son capaces de producir esporas en épocas de sequía (Whalen y Sampedro, 2010).

En cuanto a la forma de obtención de energía en el suelo, los hongos pueden ser divididos en tres grupos: los **descomponedores**, los **mutualistas** y los **parásitos** o **patógenos** (Bridge y Spooner, 2001; Dighton, 2003). Los **descomponedores** son aquellos que convierten la materia orgánica muerta en biomasa fúngica,  $\text{CO}_2$  y moléculas pequeñas como ácidos orgánicos. Generalmente, utilizan sustratos complejos como la celulosa y la lignina, especialmente las clases *Ascomycota* y *Basidiomycota* y, al igual que las bacterias, son importantes en la inmovilización o retención de nutrientes en el suelo (Boer *et al.*, 2005). Los hongos **mutualistas** (micorrizas, micelios de hongos asociados a raíces de plantas) son los que colonizan las

raíces de plantas (relación simbiótica), no son dañinos para las plantas y degradan los azúcares produciendo energía (Bridge y Spooner, 2001; Rillig y Mummey, 2006). Por último, están los **parásitos** o **patógenos** que cuando crecen próximos a las raíces de las plantas, causan la reducción de la producción de estas y la muerte de otros microorganismos y como consecuencia son responsables de muchas enfermedades causadas a las plantas (Thorn y Lynch, 2007; Maier *et al.*, 2009). Al contrario que las bacterias, que consumen los sustratos orgánicos por contacto directo, algunos hongos producen extensiones de sus micelios que atacan las paredes celulares de las células vegetales (Lavelle y Spain, 2003).

### 1.2.3 OTROS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SUELO.

Las algas, los protozoos, los virus y las arqueas son ejemplos de otros microorganismos presentes en el suelo, algunos de ellos en menor cantidad comparado con las bacterias y hongos. De entre ellos, las algas son microorganismos que metabolizan nutrientes en presencia de la luz y utilizan el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Producen también, una gran cantidad de polisacáridos extracelulares que ayudan en la formación de los agregados de partículas del suelo (Maier *et al.*, 2009). Las algas verdes inmóviles son comúnmente encontradas en el suelo y predominan en suelos ácidos. Presentan formas filamentosas y cocoides, siendo éstas últimas las más comunes en suelos desérticos. En general, los géneros más frecuentemente encontrados en el suelo son *Actinochloris*, *Ankistrodesmus*, *Bracteacoccus*, *Characium*, *Chlorella*, entre otros (Thorn y Lynch, 2007). La presencia de algas en el suelo varía de acuerdo con las estaciones del año, aumentando en primavera y disminuyendo en verano y otoño debido a la desecación, y en invierno, por las bajas temperaturas (Bloem *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2009). En general, las algas son extremadamente sensibles a la presencia de contaminantes, nutrientes y pesticidas por lo que se pueden usar como indicadores biológicos (Lavelle y Spain, 2003; Bloem *et al.*, 2006; Thorn y Lynch, 2007).

Los protozoos, por el contrario, son microorganismos heterotróficos que sobreviven consumiendo bacterias, levaduras, hongos y algas. Existen evidencias de que también tienen una cierta participación en la descomposición de la materia orgánica del suelo. Generalmente viven en los primeros 15 a 20 cm del suelo debido a que requieren grandes cantidades de microorganismos para su alimentación (Maier *et al.*, 2009). Su función en el suelo es la regularización y modificación del tamaño y composición de la comunidad microbiana, la excreción directa de nutrientes y la inoculación de nuevos sustratos (microorganismos que están adheridos a la superficie de organismos más grandes) (van Elsas y Smalla, 1997). Estos microorganismos se clasifican en flagelados, ciliados y amebas, siendo este último grupo el más comúnmente encontrado en el suelo (Maier *et al.*, 2009).

Los virus están diversamente distribuidos en suelos tropicales y temperados e, incluso, han sido detectados en ambientes extremos de la Tierra, como, por ejemplo, en los suelos helados de la Antártida o en el desierto de Namibia. Estos microorganismos modifican la comunidad microbiana del suelo. Algunos virus se estabilizan y persisten en el suelo hasta encontrar un hospedador. El género



*Tobamovirus*, que causa graves enfermedades en plantas llegando a provocar necrosis generalizada, es capaz de persistir en el suelo y de sobrevivir a esterilización del suelo por autoclave (Bloem *et al.*, 2006; Whalen y Sampredo, 2010). La utilización de estiércoles o lodos de depuradora como fertilizantes orgánicos en suelos agrícolas es una forma de introducir virus que producen enfermedades en mamíferos y humanos en ese ecosistema, aunque los enterovirus por ejemplo, se inactivan tras periodos de días o semanas en el suelo. Los hongos presentes en el suelo también pueden verse afectados por los virus (como por ejemplo, los micovirus) (Whalen y Sampredo, 2010).

Y por último, el grupo de las arqueas es similar a las bacterias solamente en su tamaño y forma, siendo muy diferentes genética y bioquímicamente (Maier *et al.*, 2009). Los géneros más representativos son: *Halobacterium*, *Natronobacterium*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum* y *Methanococcus* (metanógenos); *Archeoglobus*, *Thermococcus* y *Thermoplasma* (termófilos extremos); *Sulfolobus* y *Acidothermus* (termoacidófilos); y *Pyrodictium* (anaerobios estrictos) (Paul, 2007). Estos microorganismos predominan en ecosistemas con altas temperaturas o hipersalinos (Sylvia, 2005), pero también han sido detectados en ambientes no extremos en suelos prístinos de China y América (Fan *et al.*, 2006).

### **1.3 VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DEL SUELO.**

---

La composición del suelo puede ser alterada tanto por diversas actividades antropogénicas como por aspectos naturales (condiciones abióticas y bióticas) en la forma y la biodisponibilidad de los nutrientes del suelo y, como consecuencia, en las poblaciones microbianas presentes en él (Blanco y Lal, 2010).

Las condiciones ambientales características de cada clima parecen producir cambios temporales en la comunidad microbiana del suelo (Feng *et al.*, 2003). Estos factores ambientales pueden ser divididos en dos grupos respecto a sus efectos: los que afectan directamente a la estructura de la comunidad microbiana del suelo y sus actividades (humedad, temperatura, pH, contenido de materia orgánica) y otros factores que producen efectos indirectos (latitud, elevación, clima, textura, profundidad y minerales del suelo, posición topográfica y naturaleza de la vegetación presente) (Brockett *et al.*, 2011). Entre esas variables ambientales, el pH del suelo ha sido frecuentemente correlacionado con la estructura de la comunidad microbiana del suelo, particularmente las bacterias (Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2009b; Brockett *et al.*, 2011).

En líneas generales, los cambios de las condiciones ambientales del suelo pueden ser perjudiciales para la comunidad microbiana presente en ese ecosistema. Un ejemplo de cambio ambiental importante es la sequía. Ese tipo de estrés es quizá el más común para los organismos que pertenecen al suelo. La región mediterránea es un ejemplo de clima semiárido donde los periodos de sequía son muy frecuentes (Schimel *et al.*, 2007). El aumento de la erosión del suelo y las altas temperaturas que se produce en esta región conlleva la pérdida del carbono de los suelos. En climas áridos y semiáridos la pérdida de carbono del suelo es aún mayor, comparada con la que se

produce en climas húmedos y fríos. Esta pérdida disminuye la calidad del suelo, pues existe una gran evaporación y una reducción de la actividad y diversidad de las especies de la microfauna del suelo. Una forma de estabilizar el suelo es mediante la utilización de fertilizantes orgánicos como, por ejemplo, estiércol, lodos de depuradora, compost o biosólidos. Según la literatura, la utilización de fertilizantes orgánicos en el suelo es una práctica agrónomicamente ventajosa puesto que es una forma de mejorar las propiedades de éste y de incrementar la materia orgánica y la concentración de nitrógeno y fósforo en el suelo (García-Gil *et al.*, 2004), aumentando así, la actividad microbiana y enzimática del suelo (Turovskiy y Mathai, 2006).

Además de las condiciones ambientales, las actividades antropogénicas también alteran la microbiota del suelo. El mismo proceso de recuperación de suelos mediante la utilización de fertilizantes ricos en nitrógenos es una de ellas, pues aumenta la actividad microbiana y como consecuencia, la descomposición de la materia orgánica, aumentando el carbono orgánico total del suelo (Bot y Benites, 2005). Esto provoca un incremento en el desarrollo de los cultivos, con el consiguiente incremento de la biomasa microbiana y su actividad (Ros *et al.*, 2003; Bastida *et al.*, 2008; Tejada *et al.*, 2008). Otros ejemplos de actividades antropogénicas son la minería, la acumulación de productos difícilmente degradables (como por ejemplo, el petróleo y metales pesados, entre otros) (Balba *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2010), los incendios o la irrigación, y estas alteraciones pueden llevar a efectos indirectos en el desarrollo del suelo (Maier *et al.*, 2009). Una de las consecuencias de esas alteraciones es la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera que favorece el cambio climático siendo uno de los problemas más preocupantes en todo el mundo (Hunter, 2008; Blanco y Lal, 2010). El incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera afecta a la vegetación, llevando a una disminución importante de la biomasa existente en el suelo (Bardgett *et al.*, 2001).

De entre estas actividades humanas, uno de los principales efectos negativos de la minería es la acumulación de metales pesados en los suelos. Los metales pesados constituyen una amenaza peligrosa para el agua, el suelo y los sedimentos (Pérez-de-Mora *et al.*, 2006). Esa contaminación provoca una disminución en la biomasa y el número de microorganismos (Chander y Brookes, 1991), de la actividad enzimática (Ohtonen *et al.*, 1994), y por tanto, produce un cambio en la composición de la comunidad microbiana del suelo (Müller *et al.*, 2001). Una razón importante es la difícil degradación biológica de los metales pesados por lo que permanecen mucho tiempo en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Además, muchos de ellos son tóxicos para toda la microbiota y tienden a acumularse en la cadena alimentaria, por lo que son una de las amenazas más peligrosas para el suelo y las aguas y, como consecuencia, para la salud humana y animal (Zhang *et al.*, 2009).

Los suelos que sufren incendios también tienen alterada su composición microbiana. Además de causar un cambio en la estructura y actividad de la microbiota del suelo, el fuego destruye la cobertura vegetal y los horizontes orgánicos del suelo, oxidando y volatilizando parte de los nutrientes (Grogan *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2005). El uso de residuos orgánicos en la restauración de suelos degradados por los incendios es una práctica común y aceptable, siempre que se respeten determinados aspectos relacionados con la prevención de la contaminación (Ros *et al.*, 2003). La mayoría de las mejoras causadas por estas enmiendas se debe al

incremento temporal en el contenido en materia orgánica y nutrientes que favorecen la recolonización vegetal y la recuperación de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas (Guerrero *et al.*, 2001; Villar *et al.*, 2004; Bastida *et al.*, 2007b).

## 1.4 LOS LODOS DE DEPURADORA COMO ENMIENDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS.

---

El término original usado para describir todos los residuos de una planta de tratamiento de aguas residuales fue *lodos*. De hecho, *lodo* es el componente sólido o semilíquido de algunos tipos de efluentes residuales. El término *residual* se usa ahora para describir todos los residuos del proceso de una planta de tratamiento, bien sean líquidos, sólidos o gaseosos. La cantidad de los residuos sólidos o líquidos generados en el tratamiento de plantas de aguas residuales depende de diversos aspectos como la cantidad del agua bruta, la dosis de productos químicos, el rendimiento del proceso de tratamiento, los métodos de remoción de lodos, la eficiencia de la sedimentación y la frecuencia del limpieza del filtro (retrolavados) (Cornwell, 2002). Actualmente, el tratamiento y vertido de residuos de una planta de tratamiento de agua es parte integral de las operaciones de estas plantas debido a que las reglamentaciones locales y estatales tienen normas más restrictivas para los programas de gestión de residuos tradicionalmente practicados. En Estados Unidos de América, el vertido de residuos no tratados a la mayoría de aguas superficiales está severamente restringido por el Sistema Nacional de Eliminación de Vertidos Contaminantes (NPDES) del Acta del Agua Limpia (Cornwell, 2002).

Los lodos de depuradora de aguas residuales (LDAR) están generalmente compuestos por sólidos generados durante el tratamiento de aguas residuales que son, básicamente, biomasa microbiana. A pesar de tener una composición química variable, los LDAR son ricos en materia orgánica y nutrientes esenciales para las plantas y microorganismos. Dependiendo del origen de las aguas residuales, estos residuos pueden contener altos niveles de metales como Zn, Cu y Cd y xenobióticos, además de microorganismos patógenos para animales y humanos y por eso, es necesario que estos residuos sean tratados adecuadamente (Bitton, 2005b; Lambais y do Carmo, 2008).

Los lodos suelen ser eliminados de tres maneras: utilización como enmiendas en suelos agrícolas (como fertilizante orgánico), eliminación en vertederos e incineración (Grøn *et al.*, 2007; Wolna-Maruwka *et al.*, 2007). Estos dos últimos métodos son técnicas que acarrearán efectos negativos para el clima, porque la acumulación en vertederos genera gas metano y la incineración, CO<sub>2</sub> y, además, la materia orgánica y los nutrientes presentes en estos residuos son eliminados en lugar de ser reciclados (Grøn *et al.*, 2007). Actualmente en España el 65 % de los LDAR son utilizados como enmiendas en los suelos y el 60 % en los Estados Unidos de América. Según la clasificación realizada por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (US EPA, United States Environmental Protection Agency), los lodos de depuradora tratados se les denominan *biosólidos* y se clasifican en dos tipos: biosólidos de clase A y de clase B. Los biosólidos de clase A son tratados hasta el punto en que la concentración de patógenos se reduce a niveles tan bajos que no se

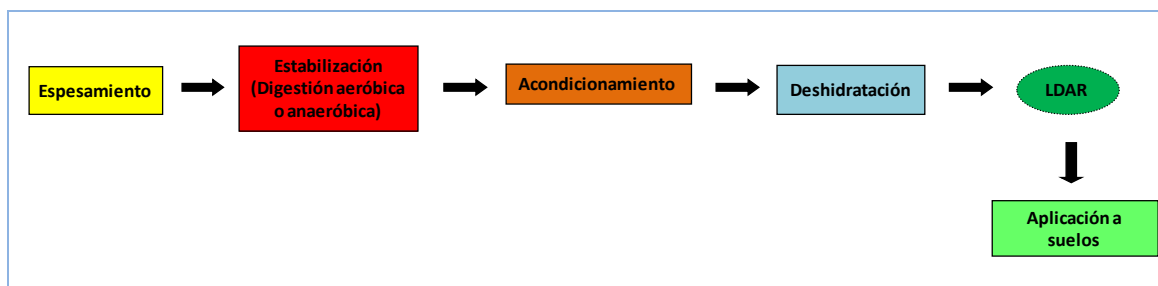
requieren restricciones adicionales o precauciones de manejo especiales. Estos residuos pueden ser utilizados en suelos agrícolas y también en áreas públicas como en los jardines residenciales. Los biosólidos de clase B son sometidos a un tratamiento (digestión mesófila anaeróbica) que reduce pero no elimina todos los patógenos y son utilizados exclusivamente en suelos agrícolas prohibiéndose su utilización en lugares de acceso público (United States Environmental Protection Agency, 1995). Éstos últimos son utilizados más frecuentemente en los Estados Unidos de América (Brooks *et al.*, 2007a; Pepper *et al.*, 2008).

En España, la legislación que desarrolla todos estos aspectos se encuentra en el Plan Nacional de Lodos de Depuradora de Aguas Residuales (PNIR) que controla el uso de los LDAR (Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009). La utilización de los LDAR en agricultura debe hacerse teniendo en cuenta las necesidades de nutrientes de las plantas y la seguridad alimenticia. Así, está prohibida la aplicación de lodos en cultivos hortícolas y frutícolas durante su ciclo vegetativo o menos de 10 meses antes de la recolección y durante la recolección de ambos cultivos, puesto que son consumidos en fresco y están normalmente en contacto con el suelo. Esta prohibición se basa en la posibilidad de adición de sustancias peligrosas que pudieran entrar en la cadena alimentaria, entre otras los metales pesados. Por esa razón, se limita el contenido en metales pesados en los lodos y se exigen análisis periódicos de los suelos, y de los LDAR cada 6 meses en la fase de producción. Estos análisis incluyen la determinación de parámetros generales (pH, conductividad, materia seca, materia orgánica, propiedades físicas y reológicas) y la presencia de elementos inorgánicos y compuestos orgánicos, y la realización de análisis microbiológicos para detectar la presencia de patógenos de origen fecal. Finalmente, se establece la exigencia de un control estadístico de los LDAR producidos, las cantidades dedicadas a fines agronómicos, su composición y características, los tipos de tratamiento, el destino y los lugares de aplicación (PNIR 2007-2015) (Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009).

Los tratamientos utilizados para eliminar estos contaminantes orgánicos en los LDAR son los procesos de biodegradación microbiana (Figura 2). Las digestiones aeróbica y anaeróbica, y el compostaje de estos residuos pueden reducir significativamente la concentración de muchos tipos de contaminantes orgánicos. La degradación de estos contaminantes es más efectiva en la digestión aeróbica que en la anaeróbica (Smith, 2009).

La digestión aeróbica consiste en añadir aire u oxígeno al lodo almacenado en un depósito a una concentración superior a 1 mg/L para evitar la producción de malos olores. Los microorganismos degradan aeróbicamente los sustratos orgánicos disponibles y reducen los sólidos volátiles del lodo en un 40-50%. Este proceso, de bajo coste y fácil manipulación, reduce considerablemente la cantidad de patógenos en los LDAR antes de poder ser utilizados como enmiendas agrícolas (United States Environmental Protection Agency, 1995). La digestión anaeróbica de los lodos, por el contrario, consiste en una serie de procesos microbiológicos en condiciones anaerobias que convierten los compuestos orgánicos en metano y dióxido de carbono, y reducen los sólidos volátiles en un 35-60 %, dependiendo de las condiciones del proceso. Para promover la anaerobiosis se inyecta gas metano y se utilizan altas temperaturas. Al igual que el anterior, reduce la cantidad de microorganismos

patógenos en el producto final. El paso siguiente es el acondicionamiento de los LDAR que puede hacerse por tratamientos químicos (se añaden acondicionantes) o por calor (tratados a una temperatura de 175-230°C). Este paso facilita la separación de los sólidos de la fase líquida y reduce la afinidad del lodo con el agua. Posteriormente, se deshidrata el lodo por filtración o mediante lechos de secado. Tras este proceso los LDAR ya estarán listos para ser utilizados como enmiendas en suelos agrícolas posteriormente a su extracción manual o mecánica después del secado. El tratamiento de los LDAR y su eliminación son operaciones costosas en el tratamiento de aguas residuales de plantas (Bitton, 2005b).



**Figura 2. Esquema del tratamiento de lodos de depuradora de aguas residuales.**  
Modificado de (Bitton, 2005b).

La aplicación de estos desechos tratados en los suelos agrícolas es la forma más utilizada y más económica, y constituye una oportunidad de reciclar estos residuos e incrementar la materia orgánica del suelo, mejorando así la producción de los cultivos (Cátricala *et al.*, 1996; Grøn *et al.*, 2007). Además, podría facilitar la recuperación de los suelos mediterráneos que tienden a una pérdida de nutrientes por erosión y, por tanto, evitar la pérdida de carbono y mejorar su calidad. Los suelos mediterráneos son muy pobres en materia orgánica (contienen menos de 1% de carbono orgánico total) y su contenido en metales pesados es relativamente bajo, lo que abre amplias posibilidades de reciclaje de una parte importante de los lodos de depuradora (PNIR 2008-2015) (Grøn *et al.*, 2007; Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009). Por lo tanto, la utilización de enmiendas de lodos de depuradora en suelos puede ser también una manera de recuperar suelos degradados de todo tipo (Ros *et al.*, 2003; Larchevêque *et al.*, 2005).

Sin embargo, de esta aplicación también pueden surgir problemas medioambientales porque no se conoce completamente hasta qué punto la utilización de los LDAR puede ocasionar consecuencias perjudiciales para los suelos o la atmósfera: la mineralización del carbono añadido, la adición de patógenos y/o microorganismos resistentes a antibióticos que son capaces de contaminar acuíferos o cultivos y la modificación de la comunidad microbiana del suelo. Son problemas importantes, puesto que se podría incrementar la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera aumentando así, el cambio climático, y a la vez podría producir modificaciones en las poblaciones microbianas naturales de los suelos.

Por tanto, su utilización debe hacerse con las máximas garantías de seguridad para la salud pública y los lodos deben ser evaluados tal y como recomienda la legislación vigente y la Organización Mundial de la Salud (RD 13/10/1990) (BOE 1990)

(<http://www.who.int/hia/en/>). Además, para la utilización de los LDAR es necesario que se sometan previamente a procesos biológicos (aerobios o anaerobios), térmicos, químicos o de almacenamiento prolongado. Algunos estudios han detectado cambios en la microbiota del suelo (Petersen *et al.*, 2003; Hölzel *et al.*, 2010; Nakatani *et al.*, 2011) y contaminación con metales pesados o xenobióticos (Barajas-Aceves y Dendooven, 2001; Barajas-Aceves *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2003; Mantovi *et al.*, 2005), como consecuencia del uso de los lodos de depuradora como fertilizantes orgánicos.

#### **1.4.1 ¿LOS LODOS DE DEPURADORA PUEDEN INTRODUCIR MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS?**

La utilización de lodos de depuradora en los suelos permite fertilizarlos añadiendo nutrientes (N, P, Na, K) y recuperando su estructura por la incorporación de materia orgánica (Whalen y Sampedro, 2010). Sin embargo, la presencia de sustancias químicas potencialmente tóxicas como metales, detergentes, pesticidas y diversos productos farmacéuticos (inhibidores hormonales, antiinflamatorios o antibióticos) implica un riesgo potencial que puede afectar a los organismos del suelo o plantas y producir cambios en la estructura de la comunidad microbiana y las propiedades del suelo (Carbonell *et al.*, 2009). Uno de esos cambios es la posible aparición de bacterias resistentes a antibióticos, producto de que los lodos de depuradora pueden contener una gran cantidad de desechos hospitalarios (Brooks *et al.*, 2007b). En su composición también puede existir bacterias patógenas que pueden acumularse y persistir en los suelos convirtiéndose en riesgos potenciales para la salud humana (United States Environmental Protection Agency, 1995; Grøn *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

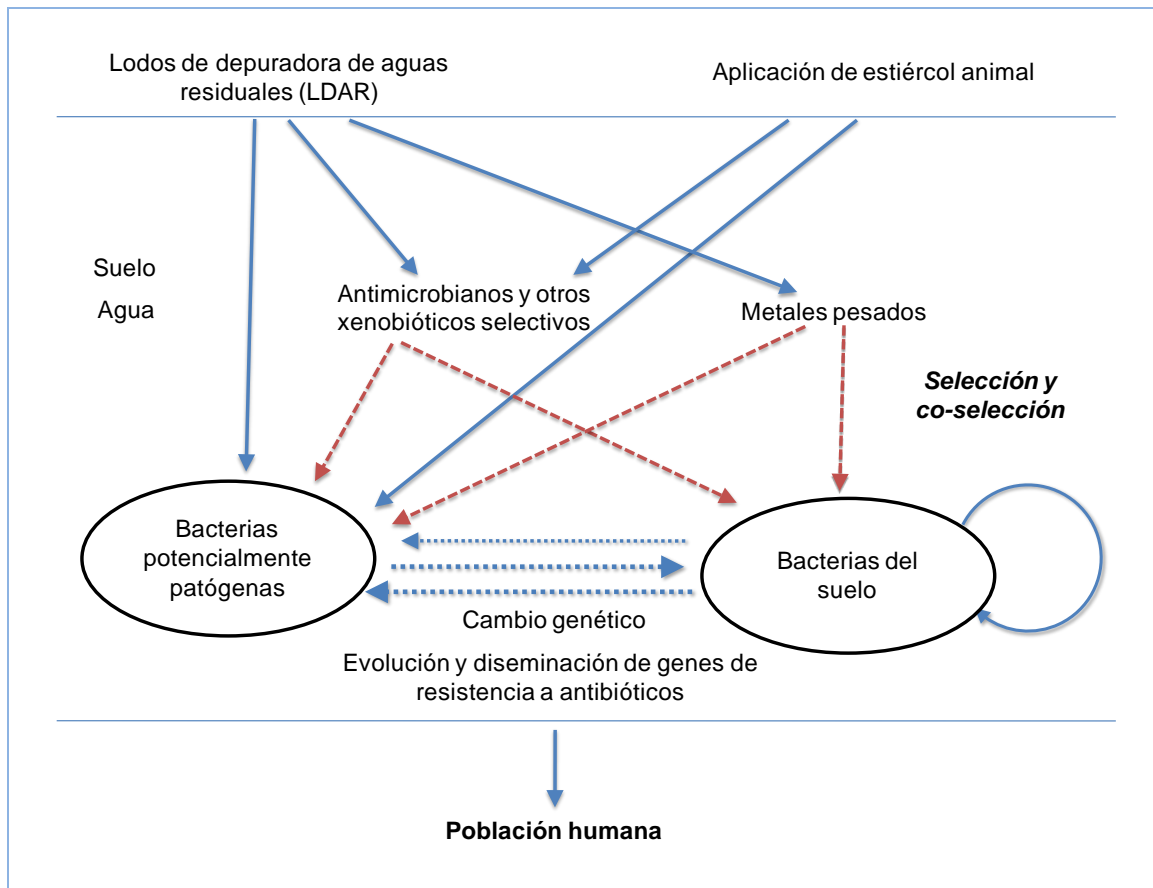
Un aspecto preocupante a tener en cuenta para la utilización de lodos de depuradora en suelos agrícolas es la posibilidad de la transferencia de genes que confieran resistencia a antimicrobianos. La resistencia a antimicrobianos provoca que estas sustancias pierdan su eficacia para la eliminación de agentes patógenos poniendo en peligro la vida humana (Kümmerer, 2001; Kümmerer, 2004; Gaze *et al.*, 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los suelos hay bacterias y hongos que producen antibióticos de forma natural. Las bacterias filamentosas de los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Actinomadura* son capaces de producir antibióticos betalactámicos, como también los hongos del género *Penicillium* (Baquero y Cantón, 2009).

La presencia de patógenos en el suelo puede indicar la presencia de microorganismos resistentes a antibióticos que constituyen reservorios potenciales de estos genes y ejercen un papel importante en la ecología de la resistencia a antimicrobianos en las poblaciones bacterianas (Brooks *et al.*, 2007b; Demanèche *et al.*, 2008). La contaminación por metales pesados en los suelos puede también seleccionar indirectamente bacterias resistentes a antibióticos, desde que se observaron correlaciones entre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos y de mercurio en sedimentos fluviales (Nielsen y Winding, 2002).

En España no existe ninguna legislación que indique valores máximos admitidos de microorganismos patógenos en los LDAR. Sin embargo, en otros países como en los Estados Unidos de América, el nivel máximo permitido de coliformes fecales presentes en los lodos digeridos anaeróbicamente puede llegar hasta  $2 \times 10^6$  NMP por gramo de materia seca (United States Environmental Protection Agency, 1995). Por tanto, la utilización de LDAR como fertilizantes de suelos agrícolas es un procedimiento polémico por la posible contaminación de suelos y aguas y además, la difusión de patógenos en el medio ambiente (Gerba y Smith, Jr., 2005; O'Connor *et al.*, 2005). Esta posible contaminación ha sido relacionada con la emergencia de diversas enfermedades infecciosas en humanos, ganado y animales silvestres. La forma de evitar estas enfermedades ha sido el desarrollo continuo de nuevos antibióticos y el incremento de su utilización para exterminar estas enfermedades (Levy, 2002b; Sarmah *et al.*, 2006). La principal barrera en el uso de LDAR como fertilizante va a depender del tratamiento inicial del lodo para reducir el número de patógenos presentes (Lang y Smith, 2007). En Europa, la Directiva del uso de los lodos 86/278/EEC, señala las concentraciones máximas permitidas de metales en lodos de depuradora destinados al uso en suelos agrícolas e indica además, la necesidad de tratamientos en ellos, con el fin de reducir la cantidad de patógenos presentes en estos residuos (Grøn *et al.*, 2007).

El uso indiscriminado de antibióticos en la alimentación animal en todo el mundo produce la selección de bacterias que portan genes de resistencia y que son eliminados con sus excretas (Aarestrup, 2005). Esta selección de bacterias resistentes puede ocurrir en sistemas de tratamiento de aguas residuales, en ambientes agrícolas donde los antibióticos pueden ser de origen veterinario, o en ambientes prístinos en general donde la selección es producida por bacterias que producen antibióticos (Gaze *et al.*, 2008). Como consecuencia, hay un incremento dramático de la multirresistencia y de la cantidad de bacterias patógenas resistentes a antibióticos clínicamente importantes utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, especialmente las que son causadas por patógenos entéricos (Levy, 2002b; Mølbak, 2004). Diversos estudios han encontrado un gran nivel de resistencia a antibióticos en distintos tipos de estiércol utilizados para la aplicación en los suelos (Heuer y Smalla, 2007) y consecuentemente, en los suelos, aguas superficiales y productos vegetales (Sarmah *et al.*, 2006). Prácticas como la aplicación de LDAR y estiércol de animales en los suelos introducen mezclas complejas de antibióticos de uso médico y veterinario, bacterias que contienen genes de resistencia, y otros compuestos químicos como detergentes y surfactantes que pueden contaminar el suelo y el agua y promover un cambio genético de las bacterias autóctonas de ese ecosistema. La resistencia a antimicrobianos podría adquirirse mediante transferencia horizontal de genes (THG) (Gaze *et al.*, 2008) (Figura 3). Sin embargo, la transferencia horizontal de genes en las poblaciones microbianas del suelo sólo ha podido ser constatada hasta el momento y de forma muy reciente en el caso de microorganismos asociados con purines (Heuer y Smalla, 2007) (Binh, 2008 BINH2008 /id}, a diferencia de otras posibles fuentes (no se ha detectado la transferencia del marcador de resistencia a ampicilina procedente de vegetales transgénicos) (Demanèche *et al.*, 2008). Estas resistencias a antibióticos podrían llegar al ser humano mediante diversos procesos entre los que no se puede obviar la alimentación con vegetales o animales criados en parcelas tratadas con residuos fecales que son utilizados habitualmente como enmiendas agrícolas. Prueba

de este paso son los resultados del análisis de las heces de un ave silvestre común en España (chova piquirroja, *Pyrhocorax pyrrhocorax*). En ellas existían microorganismos resistentes a antibióticos que presentaban perfiles de resistencia distintos según la zona de muestreo. Así, aquellos próximos a zonas residenciales (Madrid), presentaban resistencias de origen médico, mientras que los procedentes de zonas rurales (Segovia), presentaban resistencias más frecuentes en heces animales. Los autores sugieren que la alimentación a partir de cultivos y campos tratados con lodos animales o urbanos contribuyen a la adquisición de estas resistencias (Blanco *et al.*, 2009).



**Figura 3. Prácticas de gestión del suelo y flujo genético.**

Modificado de (Gaze *et al.*, 2008).

Estos datos sugieren que es necesario conocer mejor los procesos que suceden en el suelo tras la adición de LDAR con el fin de evitar la transmisión de patógenos y/o de resistencias a antibióticos a la población humana. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo es evaluar cómo se modifican las poblaciones microbianas de los suelos cuando se utilizan lodos de depuradora como enmienda agrícola. En concreto, nuestro trabajo se ha enfocado en la detección de microorganismos indicadores de contaminación fecal como las enterobacterias, los enterococos y los clostridios, la evaluación de la microbiota bacteriana resistente a ampicilina y los cambios globales en las poblaciones microbianas del suelo mediante análisis moleculares.





## **CAPÍTULO II**

### **2. Efectos a largo plazo en las propiedades microbianas de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana.**



# Efectos a largo plazo en las propiedades microbianas de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana.

## 2.1 RESUMEN

---

**INTRODUCCIÓN:** Los suelos que se encuentran en la región mediterránea se caracterizan por ser más propensos a la degradación por erosión debido a las condiciones climáticas características como, por ejemplo, altas temperaturas, períodos de sequía y precipitaciones irregulares. La utilización de lodos de depuradora de aguas residuales (LDAR) es una buena opción para mejorar las características del suelo. Sin embargo, no se conocen completamente los efectos nocivos en la microbiota indígena del suelo, ya que en la composición de estos residuos pueden existir metales pesados, xenobióticos, bacterias patógenas y resistentes a diversos antibióticos.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Hemos estudiado la influencia de la aplicación de lodos de depuradora aerobio y anaerobio (40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup>) en diversas propiedades del suelo y de la microbiota presente en la superficie del suelo (0-20 cm) en parcelas de suelo agrícola. Mediante siembra en medios generales y específicos hemos determinado la presencia de microorganismos oligotróficos y copiotróficos, bacterias indicadoras de contaminación fecal y bacterias resistentes a distintas concentraciones de ampicilina. Además, comprobamos el efecto de los lodos sobre la biomasa microbiana y sus niveles de respiración. Estos análisis fueron llevados a cabo durante 2 años tras la aplicación de los lodos, coincidiendo con las estaciones de verano, otoño e invierno (cada 4 meses).

**RESULTADOS:** Hemos observado un incremento de la biomasa y la respiración basal en las parcelas tratadas con menores dosis de lodos, en concreto el aerobio, y una disminución en las tratadas con mayores dosis. Por el contrario, tanto los microorganismos oligotróficos y copiotróficos totales como los patógenos tuvieron recuentos superiores en los suelos tratados con mayores dosis de LDAR, incluso dos años después de la aplicación de los lodos a los suelos. El número y el porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina fueron superiores en las muestras tratadas con lodo aerobio hasta el último análisis del estudio, principalmente en las parcelas tratadas con mayores dosis.

**CONCLUSIONES:** La aplicación de los lodos, sobre todo los aerobios, influyó notablemente en la microbiota del suelo incluso dos años después de su aplicación, principalmente a dosis elevadas (160 t ha<sup>-1</sup>) llevando a una diseminación de bacterias patógenas y su mantenimiento en el suelo incluso 2 años después. El incremento de la microbiota resistente a antibióticos con la mayor dosis de lodo aerobio debe hacer reflexionar sobre la utilización de dosis elevadas en la fertilización de los suelos agrícolas. Sin embargo, las dosis bajas tampoco están exentas de problemas puesto que se incrementa la emisión de CO<sub>2</sub> en las parcelas así tratadas, provocando un incremento del efecto invernadero y del cambio climático, por lo que es necesario reevaluar la aplicación de lodos en su totalidad.



## 2.2 INTRODUCCIÓN

---

Los suelos que se encuentran en la región Mediterránea se caracterizan por ser más propensos a la degradación por erosión debido a la gran variabilidad climática que sufren, como, por ejemplo, largos periodos de sequía (aumentando los riesgos de incendios) e inconstancia en la frecuencia de las precipitaciones (de Paz *et al.*, 2006).

Muchos estudios han mostrado que la utilización de enmiendas orgánicas en suelos con esas características puede mejorar su calidad, a través del incremento de la estabilidad de los agregados, del ciclo de nutrientes, de la cobertura vegetal, de la biodiversidad, de la capacidad de almacenamiento de agua, de la biomasa, de la actividad microbiana, de la fertilidad y de la productividad del suelo agrícola (Ros *et al.*, 2003; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006; Lal, 2007; Bastida *et al.*, 2009).

Los lodos de depuradora urbana (LDAR) pueden ser uno de estos residuos orgánicos reutilizados como fertilizantes en suelos agrícolas y además, es la mejor forma de reciclarlos porque es el procedimiento más económico y práctico (Rauch y Becker, 2000). En España, la legislación para el uso de los LDAR indica que la opción más sostenible es la aplicación como enmiendas en suelos agrícolas. Un 65 % del total es utilizado de esta manera (Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009). Las otras formas de eliminar los LDAR son su acumulación en vertederos o la incineración (Grøn *et al.*, 2007; Wolna-Maruwka *et al.*, 2007). Sin embargo, estos métodos acarrear efectos negativos para el clima, porque la acumulación en vertederos genera gas metano y la incineración, CO<sub>2</sub>, entre otros gases tóxicos y, además, la materia orgánica y los nutrientes presentes en estos residuos son eliminados en lugar de ser reciclados (Bitton, 2005a; Turovskiy y Mathai, 2006; Grøn *et al.*, 2007).

Sin embargo, la utilización de los LDAR como enmiendas agrícolas depende de sus características biológicas y químicas y aunque sea la opción más utilizada, no se conoce completamente cuál es la influencia de la liberación de estos residuos en el medio ambiente. Los aspectos que se han estudiado con más intensidad corresponden a los que ejercen una influencia más clara en la salud pública, como son la contaminación con metales pesados o xenobióticos (Barajas-Aceves y Dendooven, 2001; Barajas-Aceves *et al.*, 2002; Mantovi *et al.*, 2005; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2009) o la liberación de patógenos capaces de contaminar acuíferos o cultivos (Bhattacharyya *et al.*, 2005; Gerba y Smith, Jr., 2005; O'Connor *et al.*, 2005). En España todavía no existe ninguna legislación que indique valores máximos permitidos de microorganismos patógenos en los LDAR. Sin embargo, en otros países como en los Estados Unidos de América, la Agencia Nacional de Protección al Medio Ambiente (US-EPA), indica que el nivel máximo permitido de coliformes fecales presentes en los lodos digeridos anaeróbicamente puede llegar hasta  $2 \times 10^6$  NMP g<sup>-1</sup> de lodo seco (United States Environmental Protection Agency, 1995).

Aunque los tratamientos aplicados a estos lodos previamente a su salida de las depuradoras deberían asegurar la eliminación de estos microorganismos patógenos, éstos se encuentran presentes y son transmitidos al suelo subyacente (Entry y Farmer, 2001; Estrada *et al.*, 2004; Lemunier *et al.*, 2005) y como consecuencia, éste debería ser un aspecto preocupante para las autoridades sanitarias.

Debido a estos aspectos, la utilización de los lodos como fertilizantes en suelos agrícolas es un procedimiento polémico (Lang y Smith, 2007).

Además de microorganismos patógenos, los lodos, que están compuestos principalmente por excretas humanas, pueden contener mezclas complejas de antibióticos de uso médico y veterinario, bacterias que contienen genes de resistencia, y otros compuestos químicos como detergentes y surfactantes que pueden contaminar el suelo y el agua, y producir posibles cambios genéticos en la microbiota autóctona del suelo (Brooks *et al.*, 2007a; Brooks *et al.*, 2007b; Gaze *et al.*, 2008; Baquero y Cantón, 2009). Existen estudios que hacen referencia a la posibilidad de la transferencia horizontal de genes de resistencia, puesto que las poblaciones resistentes se incrementan en un suelo tratado con LDAR (Gallert *et al.*, 2005; Heuer y Smalla, 2007) y algunos constatan efectivamente que algunos determinantes de resistencia presentes en las poblaciones del suelo tratado proceden realmente del sustrato usado en el tratamiento en el que también existen antibióticos (Binh *et al.*, 2007), pudiendo ser un factor relevante a la hora de incrementar las poblaciones de bacterias resistentes (Ghosh y LaPara, 2007). Esta posible contaminación ha sido relacionada con la emergencia de diversas enfermedades infecciosas debidas a microorganismos resistentes a una gran cantidad de antibióticos en humanos, ganado y animales silvestres (Pan *et al.*, 2011). La forma de evitar estas enfermedades ha sido el desarrollo continuo de nuevos antibióticos y el incremento de su utilización para combatir estas enfermedades (Levy, 2002b; Sarmah *et al.*, 2006). No obstante, no se conoce completamente la influencia del uso de lodos de depuradora en suelos agrícolas en este proceso, ya que en el suelo natural, prístino, también existe una vasta diversidad de microorganismos resistentes y productores de antibióticos (Allen *et al.*, 2010), como, por ejemplo, las bacterias filamentosas de los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Actinomyces* o los hongos del género *Penicillium* (Baquero y Cantón, 2009). Por lo tanto, la utilización de los LDAR en el suelo agrícola debe hacerse con las máximas garantías de seguridad para la salud pública y deben ser evaluados tal y como recomienda la legislación vigente y la Organización Mundial de la Salud (RD 1310/1990) (BOE 1990) (<http://www.who.int/hia/en/>).

El objetivo de nuestro trabajo es, por tanto, evaluar la influencia de los LDAR en las poblaciones microbianas de un suelo agrícola mediterráneo desde un punto de vista eminentemente sanitario. Para ello, hemos analizado durante dos años la evolución de la microbiota de parcelas tratadas con distintas cantidades y tipos de lodos de depuradora comparativamente con un suelo control determinando: 1) la afectación general de las poblaciones microbianas mediante la medición de la respiración y la biomasa, el recuento de microorganismos oligotróficos y copiotróficos, bacterias y hongos; 2) la aparición de microorganismos calificados como patógenos humanos e indicadores de contaminación fecal (coliformes fecales, enterococos y clostridios sulfitorreductores); y 3) la aparición de microorganismos resistentes a distintas concentraciones de ampicilina.

## 2.3 OBJETIVOS

---

El objetivo general de este trabajo consiste en analizar los efectos sobre las poblaciones microbianas derivados de la utilización de enmiendas de lodos de depuradora urbana en un suelo agrícola mediterráneo, mediante el uso de técnicas microbiológicas dependientes de cultivo. Estos objetivos han sido desarrollados a través del proyecto de investigación CGL2006-13915/CLI en el que estudiamos la evolución de la microbiota de un suelo agrícola tras la adición de lodos de depuradora urbana.

Los objetivos concretos de este capítulo son los siguientes:

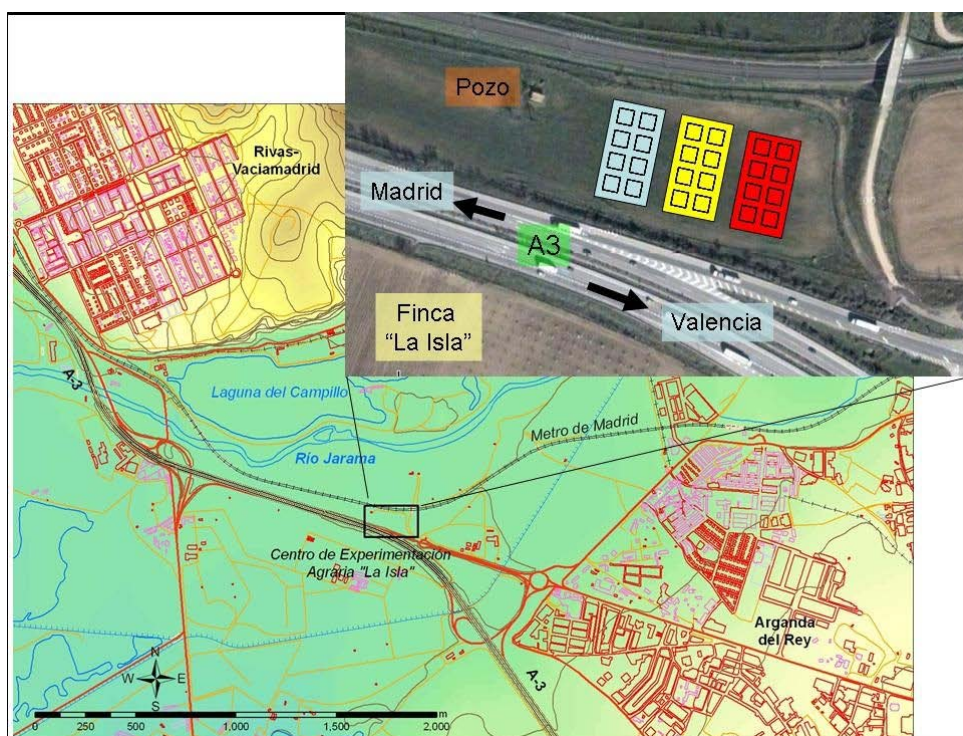
- Determinar las alteraciones provocadas en la población microbiana presente en el suelo agrícola control tras la aplicación de distintas cantidades y tipos de lodos de depuradora, mediante recuentos en medios de cultivo específicos y la medición de la biomasa y la respiración microbiana.
- Determinar la evolución y persistencia de algunos microorganismos patógenos (coliformes, enterococos, clostridios) en los suelos enmendados con lodos de depuradora.
- Analizar la evolución de microorganismos resistentes a distintas concentraciones de ampicilina en los suelos tratados con lodos de depuradora respecto del suelo agrícola control.



## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 LOCALIZACIÓN DE LAS PARCELAS.

Este trabajo se llevó a cabo entre los meses de junio de 2007 y junio de 2009 en el Centro de Experimentación Agraria “La isla” dependiente del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) de la Comunidad de Madrid en Arganda del Rey (Figura 4). Las coordenadas son 40,31468347 (latitud), -3,49746376 (longitud).



**Figura 4. Localización de las parcelas.** Localización y disposición de las parcelas en el Centro de Experimentación Agraria “La isla” del IMIDRA. En la ampliación se muestra una fotografía de satélite de la finca en la que se han dispuesto los tres bloques (Roja, Amarilla y Azul) cada una de ellas con 8 parcelas con diversos tratamientos.

El terreno sobre el que se localiza la finca está formado por sedimentos cuaternarios del río Jarama, fundamentalmente arenas y limos. Estos sedimentos de origen aluvial han dado lugar a un antiguo Fluvisol calcárico que en la actualidad presenta características propias de Antrosol (IUSS Working Group WRB, 2007), y se caracteriza por tener una marcada influencia humana debido a su uso agrícola. Morfológicamente se diferencian tres horizontes, un horizonte Ap (0-40 cm) con propiedades análogas a un horizonte Anthragric, con un contenido en carbono orgánico próximo al 1 %, un pH moderadamente básico (pH = 8), baja pedregosidad superficial y alta permeabilidad. Un horizonte subsuperficial (40-80 cm) con características de suelo de labor o compactación subsuperficial por el uso de maquinaria agrícola de manera intensiva, aunque también se aprecian morfológicamente cambios texturales de acumulación de arcillas. Este horizonte se

puede denominar *Anthraquic* ya que presenta un aumento significativo de los valores de densidad aparente, lo que se traduce en una disminución de la permeabilidad eficaz y un menor contenido en carbono. A continuación, de 80 a 240 cm, existen diversos horizontes C que se diferencian por cambios texturales de los materiales, y provienen del transporte fluvial.

La textura del suelo se describe en la Tabla 1.

TEXTURA	CANTIDADES (%)
% Arena fina	7,8
% Limo	41,3
% Arena	23,6
% Arcilla	27,3
Clase textural	Franco Arcilloso

**Tabla 1. Textura del suelo agrícola mediterráneo analizado.** Datos cedidos por el grupo del Profesor Casermeiro del Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia.

#### 2.4.2 PREPARACIÓN DE PARCELAS DE ENSAYO.

Los lodos de depuradora urbana escogidos proceden de las depuradoras de Campo Real (11000 kg, aerobio) y Guadarrama medio (9000 kg, anaerobio), ambas del Canal de Isabel II de la Comunidad de Madrid.

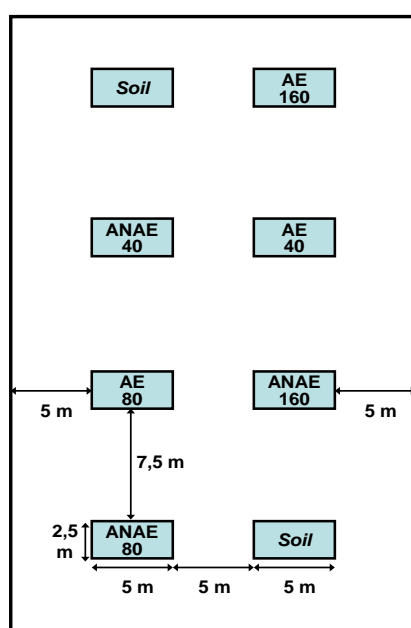
Las características químicas de los lodos se muestran en la Tabla 2.

Lodo	ms%	MO	N	Norg	pH	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	P	Fe	K	Ca	Mg
Anaerobio	17	76	9,9	6,3	7,5	1,1	16	354	0,6	16	29	523	1,2	0,7	0,26	1,7	0,25
Aerobio	14	75	5,9	4,2	8,2	0,8	17	91	0,1	21	28	237	1,7	0,4	0,54	3,5	0,30

**Tabla 2. Características fisicoquímicas de los lodos de las depuradoras.** *ms%*, porcentaje de materia seca; *MO*, materia orgánica; *N* (nitrógeno total, ‰); *Norg*, nitrógeno orgánico; y metales pesados, en mg/kg de lodo seco; *Fe* (hierro total), *P*, *K*, *Ca*, *Mg* y, en % sobre materia seca.

Los lodos se distribuyeron en las parcelas a las concentraciones establecidas el 5 de junio de 2007 de una manera aleatorizada. Su aplicación se realizó manualmente y se mezcló con el horizonte superficial del suelo mediante el uso de una vertedera simple. A partir de ese momento comenzaron los análisis subsiguientes.

La distribución de las parcelas consistió en 3 bloques con 8 parcelas de aplicación cada uno como se indica en la Figura 5. Los bloques de 8 parcelas están separados por pasillos de 10 metros que han sido frecuentemente desbrozados por el personal del Centro de Experimentación Agraria del IMIDRA “La Isla”. Cada parcela mide 2,5 x 5 metros y se encuentra distanciada de la siguiente parcela adyacente por una separación de 5 metros. De esta manera, se pretendió evitar posibles influencias o contaminaciones cruzadas entre unas parcelas y otras.



**Figura 5. Esquema de la distribución aleatorizada de los lodos aerobios y anaerobios.** Bloque tipo. AE40, AE80 y AE160 son las parcelas a las que se han añadido, respectivamente, 40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup> de lodo aerobio (AE), mientras que ANAE40, ANAE80 y ANAE160 son las parcelas a las que se han añadido, respectivamente, 40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup> de lodo anaerobio (ANAE). El suelo sin tratar es *Soil*.

Finalmente, se obtuvieron 7 tipos de suelo con distintas cantidades de lodos de depuradora aerobio y anaerobio (toneladas/hectárea), como se indica en la Tabla 3.

NOMENCLATURA	TIPO DE LODO	CANTIDAD DE LODO (TONELADAS*/HECTAREA)
SOIL	-	-
AE40	Aerobio	40
AE80	Aerobio	80
AE160	Aerobio	160
ANAE40	Anaerobio	40
ANAE80	Anaerobio	80
ANAE160	Anaerobio	160

**Tabla 3. Parcelas que fueron analizadas en este trabajo.** *Soil*, Suelo agrícola control. AE, aerobio. ANAE, anaerobio. \* Peso seco.

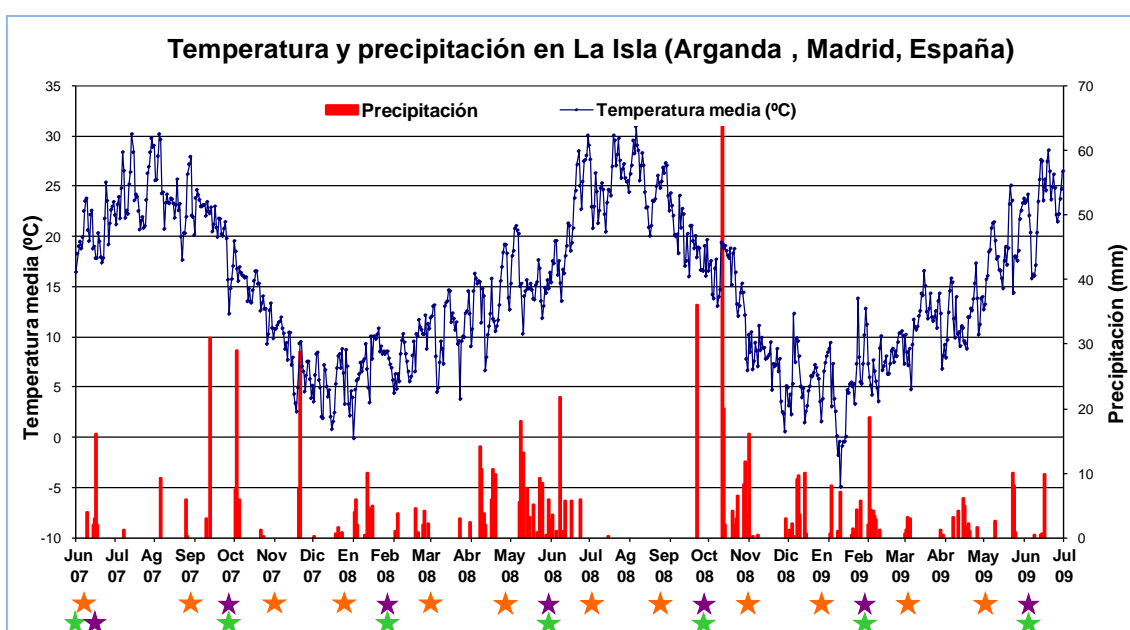
### 2.4.3 RECOGIDA DE MUESTRAS.

Las muestras se tomaron cada 4 meses comenzando tras la aplicación de los lodos en junio de 2007 (T0), seguido de muestreos en octubre de 2007 (T1), febrero de 2008 (T2), junio de 2008 (T3), octubre de 2008 (T4), febrero de 2009 (T5) y junio de 2009 (T6), conforme la metodología previamente descrita (Paetz y Wilke, 2005). Las fechas exactas de la recogida de muestras están especificadas en la Tabla 4.

La temperatura media y precipitaciones a lo largo del periodo de estudio, así como los porcentajes de humedad de las muestras recogidas están especificados en la Figura 6 y Figura 7, respectivamente.

MUESTREO	FECHA	ESTACIÓN
T0	25-JUN-2007	VERANO
T1	15-OCT-2007	OTOÑO
T2	16-FEB-2008	INVIERNO
T3	22-JUN-2008	VERANO
T4	14-OCT-2008	OTOÑO
T5	24-FEB-2009	INVIERNO
T6	01-JUN-2009	VERANO

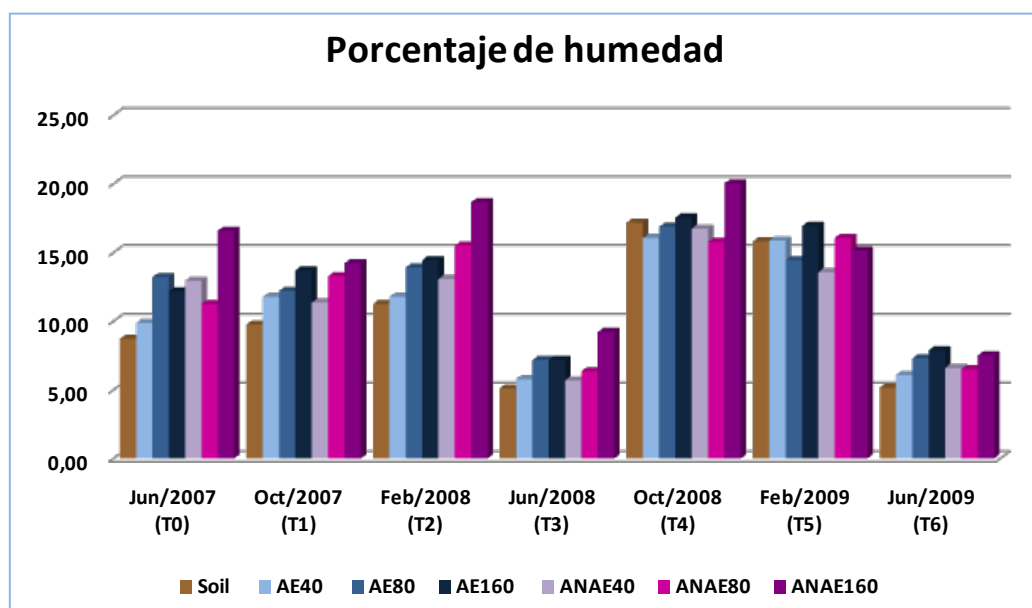
**Tabla 4. Fechas y estaciones del año de los muestreos.**



**Figura 6. Temperatura y precipitación en las parcelas durante el periodo de estudio.**

Los datos han sido obtenidos de la estación meteorológica existente en la finca de experimentación del IMIDRA *La Isla*. Las fechas de muestreo se indica con diversos colores: **en verde, muestreo microbiológico**; en naranja, muestreo de respiración (*Li-COR 8100®*) y edafológico; en violeta, muestreo de lixiviación.

Se utilizó un cilindro de 20 centímetros de profundidad (5 cm de diámetro) (*Eijkelpamp*) para obtener tres muestras de suelo de puntos distintos de cada parcela que se mezclaron en una bolsa estéril distinta para cada una de ellas. Después de mezcladas, se transfirió cada muestra a un recipiente estéril de 2 litros de capacidad. De la misma mezcla, se recogieron dos tubos de plástico de 50 mL de volumen (*falcon*) por muestra que se congelaron rápidamente *in situ* en nieve carbónica, reservando estas muestras para los análisis de las poblaciones microbianas por métodos de biología molecular. Las muestras destinadas a análisis dependientes de cultivo se almacenaron a 4°C. Las muestras destinadas a análisis molecular se congelaron y mantuvieron a -80°C.



**Figura 7. Porcentaje de humedad en los distintos muestreos del estudio.**

## **2.4.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE SIEMBRAS.**

### **2.4.4.1 MEDIOS DE CULTIVO.**

Se utilizaron diversos tipos de medios de cultivo para detectar distintos tipos de microorganismos. Los medios utilizados fueron generales (Atlas, 2004) o bien específicos, de acuerdo a diversas normativas indicadas para cada tipo de microorganismo (véase 2.4.5. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS.).

Los medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo están descritos en la Tabla 5. Se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos a excepción de los medios *Slanetz-Bartley* y *Bilis Esculina* que se esterilizaron conforme a las normas del fabricante. Cuando se utilizaron antibióticos, se añadieron después de la esterilización cuando la temperatura del medio alcanzó 55°C, aproximadamente.

MEDIOS DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	ESPECIFICACIONES, TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN
R2A	Peptona 0,5 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 0,5 g L <sup>-1</sup> Casaminoácidos 0,5 g L <sup>-1</sup> Almidón soluble 0,5 g L <sup>-1</sup> Glucosa 0,5 g L <sup>-1</sup> Piruvato sódico 0,3 g L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3 g L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> 0,3 g L <sup>-1</sup> Agar 18 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Recuento de microorganismos oligotróficos. Incubación a 30 °C/7 días.
R2A con cicloheximida	R2A + cicloheximida 200 mg L <sup>-1</sup> .	Recuento de bacterias oligotróficas. La cicloheximida inhibe el crecimiento de hongos. Incubación a 30 °C/7 días.
R2A con cicloheximida + 32 µg mL <sup>-1</sup> de ampicilina	R2A + cicloheximida 200 mg L <sup>-1</sup> Ampicilina 32 µg mL <sup>-1</sup> .	Recuento de bacterias oligotróficas resistentes a ampicilina (32 µg mL <sup>-1</sup> ). Incubación a 30 °C/7 días.
R2A con cicloheximida + 64 µg mL <sup>-1</sup> de ampicilina	R2A + cicloheximida 200 mg L <sup>-1</sup> Ampicilina 64 µg mL <sup>-1</sup> .	Recuento de bacterias oligotróficas resistentes a ampicilina (64 µg mL <sup>-1</sup> ). Incubación a 30 °C/7 días.
R2A con cicloheximida + 1 g L <sup>-1</sup> de ampicilina	R2A + cicloheximida (200 mg L <sup>-1</sup> ) Ampicilina 1 g L <sup>-1</sup> .	Recuento de bacterias oligotróficas resistentes a ampicilina (1 g L <sup>-1</sup> ). Incubación a 30 °C/7 días.
Extracto de tierra concentrado (ET)	Extracto de tierra (esterilizado durante 1 hora y filtrado) 500 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 1 g L <sup>-1</sup> Glucosa 2 g L <sup>-1</sup> Agar 18 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Recuento de microorganismos oligotróficos. Incubación a 30 °C/7 días.
Extracto de tierra diluido (ETD)	Extracto de tierra (esterilizado durante 1 hora y filtrado) 100 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 1 g L <sup>-1</sup> Glucosa 2 g L <sup>-1</sup> Agar 18 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Recuento de microorganismos oligotróficos. Incubación a 30 °C/7 días.
Agar Actinomicetos (DIFCO®)	Caseinato de sodio 2 g L <sup>-1</sup> Asparagina 0,1 g L <sup>-1</sup> Propionato de sodio 4 g L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> 0,1 g L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> 0,001 g L <sup>-1</sup> Glicerol 5 g L <sup>-1</sup> Agar 15 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Recuento de microorganismos copiotróficos. Incubación a 30 °C/7 días.
TTC (Laboratorios CONDA®)	Lactosa 20 g L <sup>-1</sup> Peptona de carne 10 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 6 g L <sup>-1</sup> Extracto de carne 5 g L <sup>-1</sup> Heptadecil sulfato sódico 0,1 g L <sup>-1</sup> Azul de bromotimol 0,05 g L <sup>-1</sup> Agar 15 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Detección de fermentadores de la lactosa. Incubación a 44 °C/2 días.
Slanetz-Bartley (S) (Laboratorios CONDA®)	Triptona 20 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 5 g L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4 g L <sup>-1</sup> Glucosa 2 g L <sup>-1</sup> Azida de sodio 0,4 g L <sup>-1</sup> Cloruro de trifeniltetrazolio 0,1 g L <sup>-1</sup> Agar 10 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Detección de <i>Enterococcus</i> sp. Incubación a 37 °C/2 días.

Bilis Esculina (BE) (Laboratorios CONDA®)	Extracto de levadura 5 g L <sup>-1</sup> Peptona 3 g L <sup>-1</sup> Tryptona 17 g L <sup>-1</sup> Bilis de buey 10 g L <sup>-1</sup> Esculina 1 g L <sup>-1</sup> Citrato férrico amónico 0,5 g L <sup>-1</sup> NaCl 5 g L <sup>-1</sup> Azida de sodio 0,15 g L <sup>-1</sup> Agar 15 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Confirmación de <i>Enterococcus</i> spp pues hidrolizan la esculina. Incubación a 44°C/2 horas.
Hierro Sulfito (HS- Concentración Doble)	Tryptona 20 g L <sup>-1</sup> Sulfito sódico 1,5 g L <sup>-1</sup> Citrato férrico 1,5 g L <sup>-1</sup> Agar 30 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL	Detección de clostridios (bacterias reductoras de sulfito produciendo sulfuro de hierro). Incubación a 37 °C/2 días en anaerobiosis (capa de agar agua).
LB XGAL IPTG AMPICILINA	Tryptona 10 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 5 g L <sup>-1</sup> NaCl 5 g L <sup>-1</sup> Agar 18 g L <sup>-1</sup> Agua destilada csp 1000 mL Después de atemperado, se añadieron al medio 100 µg mL <sup>-1</sup> de ampicilina, 0,5 mM de IPTG y 80 µg mL <sup>-1</sup> de X-Gal	Selección de bacterias con plásmidos de resistencia a ampicilina. El plásmido tiene el gen <i>lacZ</i> que codifica la beta-galactosidasa que degrada la lactosa. Cuando el plásmido no tiene inserto de DNA se expresa el gen <i>LacZ</i> completo y se produce la degradación del sustrato X-Gal, produciendo un precipitado azul. Cuando el plásmido contiene DNA insertado, el gen <i>lacZ</i> no se expresa y las colonias tienen color blanco. Se utilizó el medio LB con ampicilina para sembrar los transformantes en una placa multipocillo ( <i>backup</i> ).
SOC	Tryptona 10 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 5 g L <sup>-1</sup> NaCl 0,5 g L <sup>-1</sup> KCl 0,25 M 10 mL Agua destilada csp 1000 mL Se ajustó el pH del medio con 0,2 mL de NaOH 5M. Se añadió en esterilidad 5 mL de una solución estéril de Cl <sub>2</sub> Mg 2M y 20 mL de una solución estéril de glucosa 1M.	Transformación de <i>E. coli</i> . Incubación a 37°C/15 minutos.
TB SALES	Tryptona 12 g L <sup>-1</sup> Extracto de levadura 24 g L <sup>-1</sup> Glicerol 4 mL Agua destilada csp 1000 mL Solución de sales: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12,59 g 100 mL <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,31 g 100 mL <sup>-1</sup> Se añadió la solución de sales cuando el medio estaba atemperado para que no precipitara.	Siembra de los transformantes y extracción de DNA plasmídico. Incubación a 37°C/18 horas.

**Tabla 5. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.**

#### 2.4.4.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA CULTIVO.

Para cada muestra, se prepararon seis botellas con 90 mL de agua estéril (diluciones: -1 a -6).

- Se pesaron 10 gramos de suelo de cada una de las muestras en un recipiente estéril. Se resuspendieron con 90 mL de agua estéril y la solución resultante se introdujo en una bolsa estéril para su homogeneización.
- Se introdujo la bolsa en un aparato homogeneizador Stomacher 400 (A.J. Seward) eliminando las posibles burbujas de aire. Se homogeneizó tres veces durante un minuto con un minuto de reposo entre cada una de ellas. Se

devolvió el líquido resultante al recipiente original. De esta manera se obtuvo la dilución (-1) de cada muestra.

- A continuación, se hicieron diluciones decimales tomando 10 mL de la dilución (-1) y añadiéndolo a una botella con 90 mL de agua estéril para obtener la dilución (-2). Se procedió de la misma manera, hasta obtener la dilución (-6).
- Se comenzaron las siembras por la muestra de mayor dilución (-6) para evitar errores, inoculándose 100 µL en cada placa de medio de cultivo. Realizamos la siembra por triplicado para cada dilución con bolas pequeñas de vidrio estériles, haciendo movimientos en zig-zag.

#### **2.4.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS.**

Una vez dispuestos los lodos en las parcelas procedimos al análisis de los patógenos en el suelo en la parcela *Soil* (control) y las tratadas con lodos de depuradora. El primer muestreo (T0) se realizó 15 días después de la aplicación de las enmiendas de lodos de depuradora.

##### **2.4.5.1 COLIFORMES FECALES.**

Los coliformes fecales fueron detectados mediante siembra de las muestras del estudio en medio TTC (descrito en la Tabla 5). Para ello, se llevó a cabo una modificación del protocolo descrito en la Norma UNE-EN ISO 9308-1:2000, utilizando 100 µL de la dilución correspondiente y sembrándolos directamente en el medio TTC, por triplicado, en lugar de filtrar 100 mL de cada dilución como describe la norma.

Tras la incubación a una temperatura de 44°C durante 48 horas, se hizo el recuento de las bacterias fermentadoras de lactosa que crecieron en ese medio. Estas bacterias crecen dejando a su alrededor un halo amarillo debido al viraje de un indicador de pH (azul de bromotimol) presente en el medio tras la fermentación de la lactosa. Se hicieron tinciones de Gram para identificar cada una de las bacterias y a continuación, se sembraron por estría en medio Agar Nutritivo que se incubó a 37°C durante 24 horas. Tras esa siembra, se hicieron pruebas bioquímicas específicas (prueba de la oxidasa, indol, Voges-Proskauer, rojo de metilo y citrato - IMVIC) para identificar y confirmar la presencia de coliformes fecales (Koneman y Allen, 2008).

##### **2.4.5.2 ENTEROCOCOS FECALES.**

La presencia de enterococos en los suelos se llevó a cabo mediante una modificación del protocolo descrito en la Norma UNE-EN ISO 7899-2:2001 filtrando solamente 10 mL de cada dilución en lugar de 100 mL como describe la norma. Brevemente, se tomaron 10 mL de las diluciones adecuadas de cada muestra y se filtraron a través de un filtro *Millipore* con un tamaño de poro de 0,22 µm. Después, el



filtro se dispuso sobre el medio *Slanetz-Bartley* incubándose a 37°C durante 48 horas. Se hicieron 3 réplicas de cada dilución.

Posteriormente se hizo el recuento de las bacterias del filtro. Generalmente, las colonias de enterococos adquieren color morado por la conversión del trifeniltetrazolio en formazán. La prueba confirmativa consistió en transferir el filtro al medio Bilis-Esculina (BE) previamente calentado a 44°C, incubándose a esta temperatura durante dos horas (Koneman y Allen, 2008). Se hizo el recuento de las bacterias que presentaron color negro en BE confirmando la presencia de enterococos fecales. Las colonias de enterococos son insolubles en bilis e hidrolizan la esculina presente en el medio en esculetina, produciendo un precipitado negro.

#### **2.4.5.3 ESPORAS DE CLOSTRIDIOS SULFITOREDUCTORES.**

Se alicuotearon 10 mL de las diluciones adecuadas de cada muestra en tubos de vidrio estériles y se mantuvieron en un baño a 80°C durante 10 minutos con el fin de eliminar las bacterias en forma vegetativa. Después de ello, se mezcló bien con el medio Hierro Sulfito (HS) fundido enfriándose rápidamente a continuación. Tras la solidificación, se cubrió cada medio con agar-agua para favorecer la anaerobiosis. Se hicieron 3 réplicas de cada dilución. Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 horas, aunque se llevó a cabo un recuento a las 24 horas por si hubiera un exceso de crecimiento a las 48 horas. Con las siembras en HS, identificamos la presencia de esporas de clostridios sulfitorreductores en los distintos tipos de suelos a través de la precipitación de sulfuro de hierro, presentándose como puntos negros en dicho medio de cultivo.

#### **2.4.6 MICROORGANISMOS TOTALES (OLIGOTRÓFICOS Y COPIOTRÓFICOS), HONGOS Y BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA.**

Se sembraron 3 réplicas de cada dilución en placas de R2A, R2AC, R2AC con 32 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina (R2AC 32 µg AMP), R2AC con 64 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina (R2AC 64 µg AMP), R2AC con 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina (R2AC 1g AMP), Extracto de Tierra (ET) y Extracto de Tierra Diluido (ETD), incubándose a 30°C durante 7 días. La presencia de hongos se determinó mediante la siembra de las diluciones correspondientes en el medio Sabouraud-Cloranfenicol incubándose a 24°C durante 4 días. Tras la incubación se llevó a cabo el recuento de colonias de forma manual.

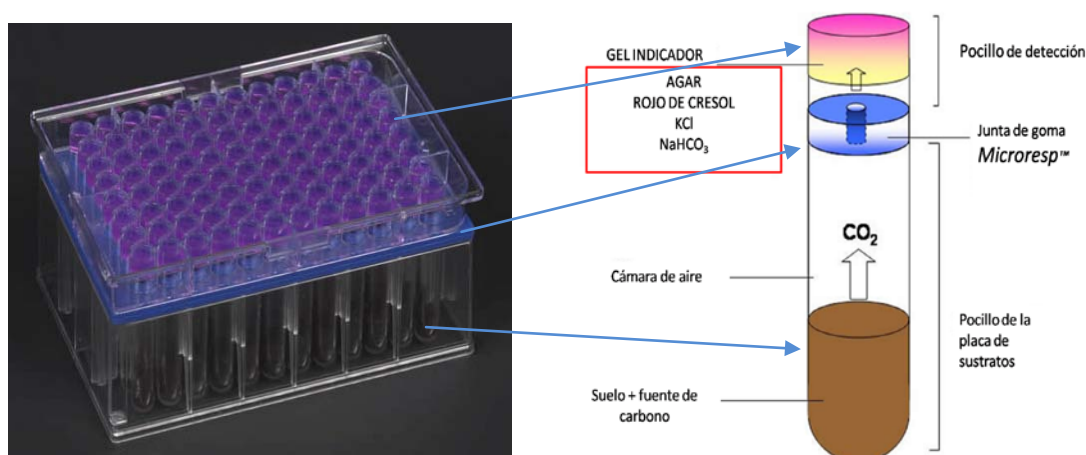
#### **2.4.7 PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DE LA BIOMASA Y RESPIRACIÓN MICROBIANA.**

Las muestras de suelo se procesaron 24 horas después de su recogida. Brevemente, se calculó su humedad (por desecación en un horno a 105°C hasta peso constante) y se añadió agua ultrapura estéril hasta que se alcanzó una humedad de

entre el 30 y el 60 % de la capacidad de campo (capacidad de campo: cantidad de agua máxima que puede captar el suelo o cantidad de agua que satura el suelo). Tras la humectación, se mantuvieron las muestras de suelo en una cámara a 24°C durante 48 horas previamente a su utilización en los análisis descritos a continuación (Campbell *et al.*, 2003).

Los valores de biomasa y respiración de las poblaciones microbianas presentes en las muestras del estudio se obtuvieron por medio de la medición de la respiración en el sistema *Microresp*<sup>TM</sup> (MSC Ltd). En el caso de la biomasa mediante la incubación con una solución de extracto de levadura (YE) (Fierer *et al.*, 2003a), mientras que en el caso de la respiración basal, mediante la adición de agua ultrapura estéril. Este método se basa en la captura del CO<sub>2</sub> producido por el suelo en un gel con un indicador que vira de color en función de la cantidad que captura (Figura 8). La medición de ese color con un espectrofotómetro de luz visible a 595 nm (*Microplate reader Model 680*, Biorad) y la utilización de unas curvas patrón nos permiten calcular la cantidad de CO<sub>2</sub> producido en ambos procesos.

Para ello, se repartió la placa multipocillo en dos mitades: las 6 primeras columnas para medición de la biomasa inducida por sustrato (extracto de levadura al 16 %) y las 6 últimas columnas para la medición de la respiración basal (agua ultrapura estéril). Se reservó la última columna de cada bloque para la medición sin muestra (sólo con YE y agua) como control de la esterilidad del proceso. La placa indicadora se midió 4 horas después de la adición de los sustratos.



**Figura 8.** Esquema de la determinación de CO<sub>2</sub> en un pocillo del sistema *Microresp*<sup>TM</sup>. Modificado de (Campbell *et al.*, 2003).

#### 2.4.7.1 MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN Y LA BIOMASA.

La medición de la respiración basal (con agua ultrapura) y de la respiración inducida a partir de una solución de extracto de levadura estéril (YE) al 16 % se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se seleccionaron las placas de detección comprobando que tuvieran un contenido correcto de agar indicador en cada pocillo junto con color un homogéneo.
- A cada uno de los pocillos de la placa se le añadió 56,25 µL de una disolución estéril de extracto de levadura al 16 % (p/v) en las 6 primeras filas o de agua ultrapura estéril en las últimas 6 filas.
- Se pesó la placa con sustratos (sin suelo).
- Se introdujo la muestra de suelo por gravedad en los pocillos de la placa de sustratos.
- Se pesó la placa ya con el suelo para conocer la cantidad real de suelo añadida por sustracción del peso de la placa con sustratos.
- Se selló la placa con la junta de goma de *Microresp*<sup>TM</sup>.
- Se midió la placa indicadora a tiempo cero en el espectrofotómetro ajustado a la longitud de onda de 595 nm.
- Inmediatamente se colocó la placa indicadora de forma invertida en la junta de goma haciendo coincidir el pocillo A1 con el pocillo A12 de la placa de sustratos y se ajustó con la carcasa metálica de *Microresp*<sup>TM</sup>.
- Se incubó el sistema completo en una estufa a 24°C durante 4 horas.
- Tras la incubación se abrió el sistema y se midió la absorbancia de la placa indicadora a 595 nm.

#### 2.4.7.2 CÁLCULO DE LAS TASAS DE RESPIRACIÓN Y BIOMASA.

Una vez obtenidos los datos de absorbancia a 595 nm, han de ser transformados a tasas de producción de CO<sub>2</sub>. Para ello:

- Se calcula la media de los valores de absorbancia medidos a tiempo 0 y 6 horas después.
- Se transforma la media de los valores de absorbancia medidos en % CO<sub>2</sub>. Para ello, tanto los de 0 horas como los de 6 horas se introducen en la siguiente expresión, obteniéndose así el porcentaje de CO<sub>2</sub> (% CO<sub>2</sub>):

$$\%CO_2 = 0,0992 + (25,49 \times (0,00000424^{\text{absorbancia}}))$$

- Se calcula la tasa de producción de CO<sub>2</sub> medida en µg CO<sub>2</sub>-C g h<sup>-1</sup> a partir de los datos de % CO<sub>2</sub> obtenidos de los cálculos anteriores mediante la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{\frac{(\%CO_2 \text{ 6h} - \%CO_2 \text{ 0h})}{100} \times 950 \times \frac{44}{22,4} \times \frac{12}{44}}{\text{Peso suelo} \times (\% \text{ peso seco}/100)} \right) / 6$$

#### 2.4.8 ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los datos de recuentos de microorganismos (CFU g<sup>-1</sup> de suelo), biomasa y respiración fueron procesados usando Excel 2007 (Microsoft Corporation). El tratamiento estadístico de los datos comenzó con la comprobación de que seguían una distribución normal mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. A continuación se realizaron los análisis de las medidas de dispersión. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas por medio del test de *Levene* y si eran homogéneas, se analizaban las medias utilizando el ANOVA de un factor para las comparaciones entre las siete muestras. Se aplicó el test *post-hoc Tukey* para la obtención de subgrupos homogéneos con un nivel de confianza superior al 95 % ( $p < 0,05$ ). Para todo ello se usó el programa SPSS v19 (IBM). Las correlaciones fueron calculadas utilizando el coeficiente *Rho* de *Spearman* en el programa SPSS v19 (IBM), al igual que los análisis de las varianzas en las poblaciones microbiológicas.

Los diagramas de ordenación mediante análisis de redundancia (RDA) fueron llevados a cabo mediante el programa *Canoco for Windows v4.5* (*Biometris, Plant Research International*) utilizando el test de permutación de Monte Carlo bajo el modelo reducido (999 permutaciones). En general, para la representación gráfica se seleccionaron aquellas propiedades significativas ( $p < 0,05$ ) que describieron la distribución.

## 2.5 RESULTADOS

---

### 2.5.1 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN MICROBIANA DE LAS PARCELAS DEL ESTUDIO.

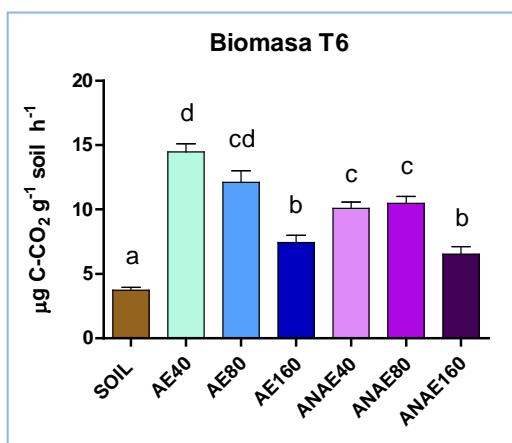
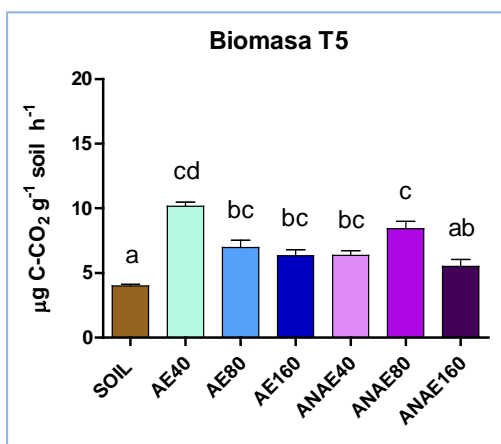
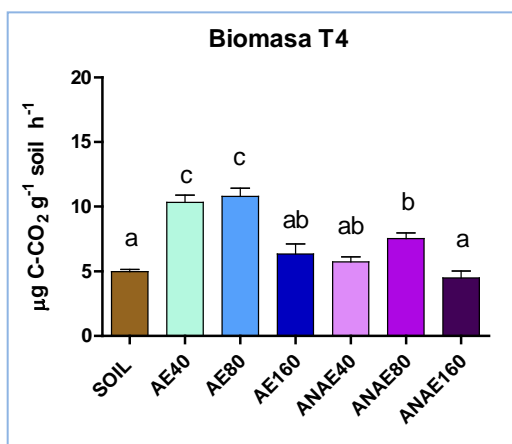
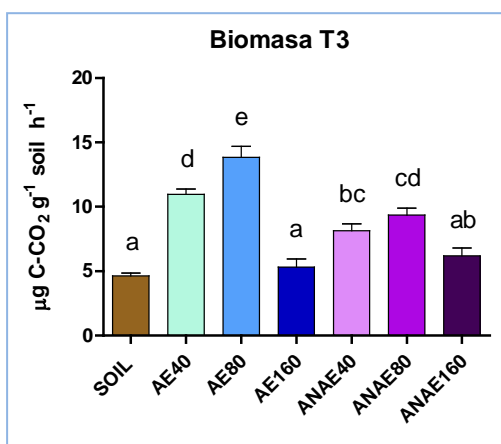
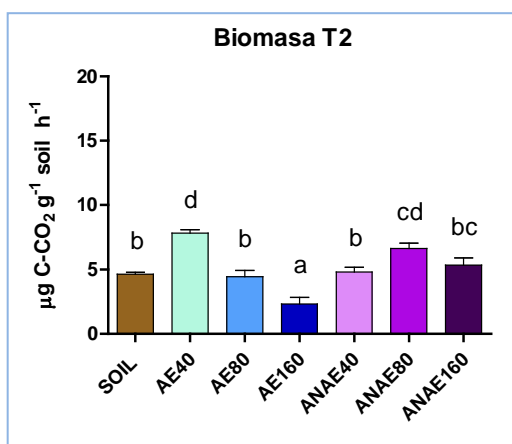
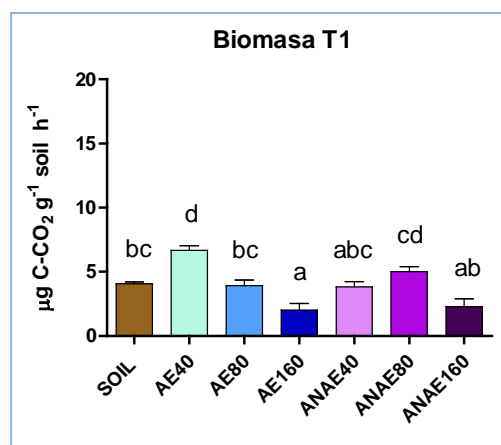
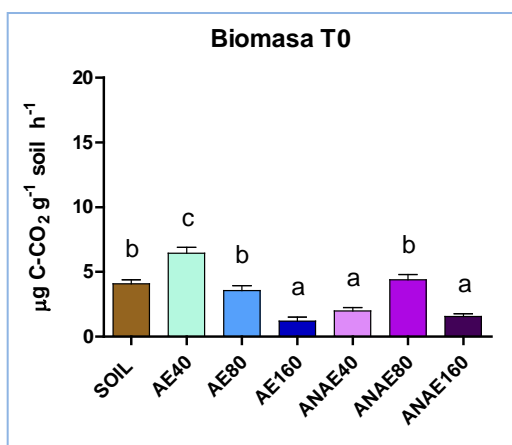
#### 2.5.1.1 BIOMASA Y RESPIRACIÓN MICROBIANA.

Hemos determinado la biomasa y la respiración microbiana de las muestras utilizando el sistema *Microresp*<sup>®</sup> mediante la medición de la respiración tras la adición de una solución de extracto de levadura (en el caso de la biomasa) (SIR, *substrate induced respiration*) o de agua estéril (la respiración basal).

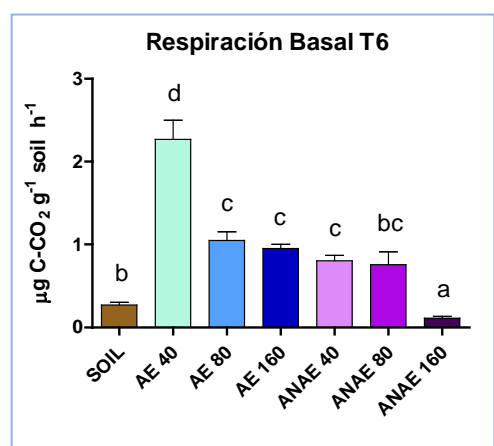
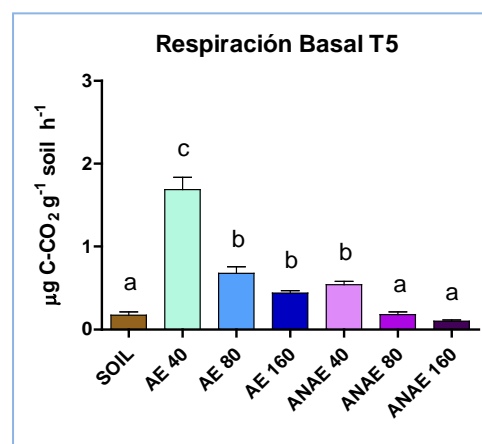
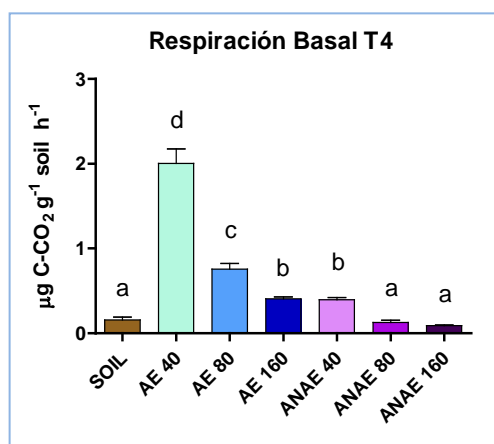
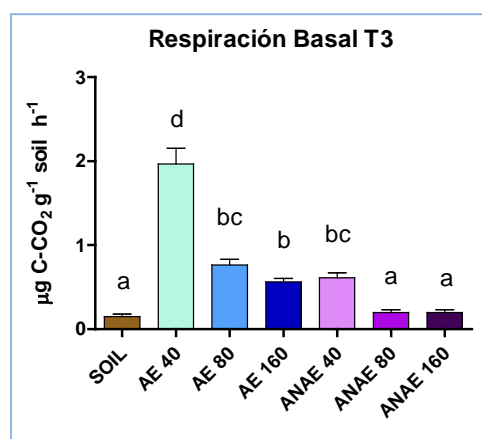
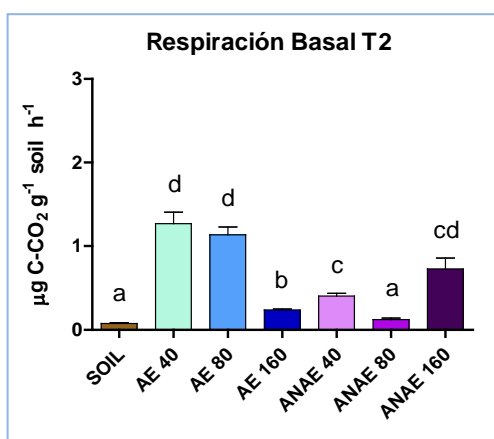
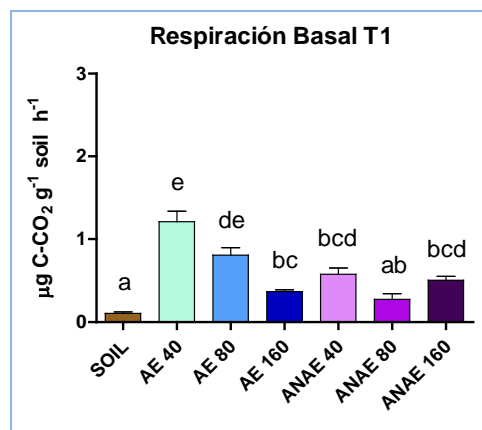
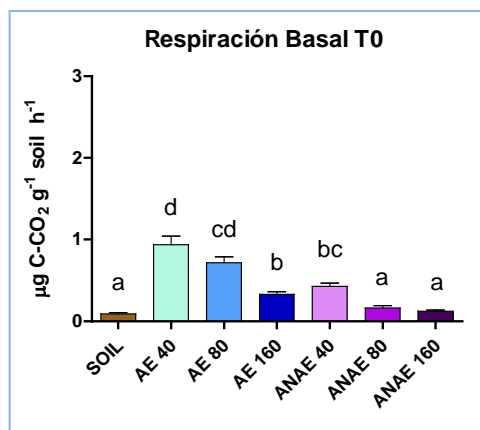
Nuestros resultados muestran que la biomasa fue mayor en las parcelas tratadas con estos residuos a dosis bajas (Figura 9). Este incremento fue más patente en las parcelas tratadas con 40 t ha<sup>-1</sup> de lodo aerobio (AE40), principalmente y en las tratadas con 40 y 80 t ha<sup>-1</sup> de lodo anaerobio (ANAE40 y ANAE80). Este patrón se mantuvo hasta el último análisis del estudio (2 años después del tratamiento) (Figura 9). Sin embargo, en las parcelas tratadas con mayor concentración de lodos de depuradora (AE160 y ANAE160) no hemos detectado un aumento importante en la biomasa microbiana y en la mayoría de los muestreos, la biomasa fue similar o superior a la medida en el suelo control (*Soil*), excepto en los primeros muestreos donde fue menor (AE160: T0, T1 y T2; ANAE160: T0 y T1) (Figura 9).

El análisis de la respiración (Figura 10) mostró un comportamiento similar al de la biomasa microbiana (Figura 9), con algunas diferencias puntuales e importantes. Estas diferencias fueron más evidentes en las parcelas enmendadas con lodo aerobio (Figura 10). En las tratadas con 40 t ha<sup>-1</sup>, la respiración fue superior en todos los muestreos respecto a las otras parcelas del estudio y esa dinámica se mantuvo hasta el último análisis, siendo incluso, superior en 3 órdenes de magnitud al de la parcela control (*Soil*) (Figura 10). En algunos muestreos (T0, T1, T2), los valores de respiración fueron similares entre las parcelas tratadas con 40 y 80 t ha<sup>-1</sup> de lodo aerobio (Figura 10). En las parcelas tratadas con lodo anaerobio no se observaron los mismos efectos: la respiración fue inferior a la de las parcelas tratadas con lodo aerobio, a excepción del último muestreo (T6) en el cual los valores de ANAE40 y ANAE80 fueron similares (Figura 10). En las parcelas tratadas con mayores dosis (ANAE160), la respiración fue inferior o similar a la del suelo control (*Soil*), a excepción de octubre de 2007 (T1) y febrero de 2008 (T2), donde los valores fueron similares a las otras parcelas tratadas con lodos de depuradora y mayores respecto a *Soil* (Figura 10).

En líneas generales, la respiración en las parcelas tratadas con lodos fue superior a la del suelo control (*Soil*) especialmente en las de menor dosis de lodo aerobio (Figura 10).



**Figura 9. Biomasa microbiana (SIR) de muestras de las parcelas del estudio.** Análisis realizado con el sistema *Microresp*<sup>®</sup> y una solución estéril de extracto de levadura (16 %). Se representa la media junto con su error estándar (SEM). *Soil*, suelo control; AE40, 80 y 160, parcelas tratadas con lodo aerobio a 40, 80 o 160 t ha<sup>-1</sup>; ANAE40, 80 y 160, parcelas tratadas con lodo anaerobio a 40, 80 o 160 t ha<sup>-1</sup>.



**Figura 10. Respiración en las parcelas del estudio.** Análisis realizado con el sistema Microresp®. Se representa la media junto con su error estándar (SEM). La nomenclatura se describe en la Figura 9.

### 2.5.1.2 MICROORGANISMOS OLIGOTRÓFICOS Y COPIOTRÓFICOS.

Hemos determinado el número de microorganismos oligotróficos en los medios R2A y ETD y los microorganismos copiotróficos, en medio Agar Actinomicetos.

En el medio **R2A**, con el que hemos cuantificado los microorganismos oligotróficos totales (Tabla 6 y Figura 11), se detectó la existencia de algunas alteraciones importantes en la microbiota oligotrófica total del suelo entre la muestra control (*Soil*) y las muestras tratadas con lodos de depuradora en el primer muestreo (junio de 2007 – T0), aunque no estadísticamente significativas. Las diferencias importantes y apreciables comenzaron a partir del muestreo de octubre de 2007 (T1) donde se apreciaron diferencias estadísticamente significativas principalmente entre la muestra control (*Soil*) y las muestras tratadas con mayores dosis de lodo (AE160 y ANAE160), existiendo un mayor número de microorganismos en esas muestras (Tabla 6 y Figura 11). Estas diferencias se mantuvieron hasta el último muestreo (T6), siendo mayor el incremento del número de microorganismos oligotróficos totales en la muestra tratada con mayor concentración de lodo aerobio (AE160).

En las parcelas tratadas con dosis intermedias se detectaron diferencias entre *Soil* y AE80 en los muestreos de octubre de 2007 – T1 y de junio de 2008 - T3 (Tabla 6 y Figura 11) siendo superior en AE80. Entre las muestras *Soil* y ANAE80, existió un incremento del número de microorganismos en el muestreo de junio de 2009 - T6. Apenas hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre *Soil* y AE40, aunque entre *Soil* y ANAE40 sí existen en los últimos muestreos (octubre de 2008 - T4, febrero de 2009 – T5 y junio de 2009 – T6) (Tabla 6 y Figura 11). En cuanto a la parcela control (*Soil*), el número de microorganismos oligotróficos totales fue similar en casi todos los análisis realizados.

MUESTRA	R2A ( $\times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> suelo)						
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	1,09 (0,01)	1,27 (0,23)	1,58 (0,22)	1,32 (0,42)	1,43 (0,26)	0,76 (0,35)	1,59 (0,44)
AE40	2,04 (0,30)	1,97 (0,31)	24,70 (19,90)	2,54 (1,12)	3,35 (0,90)	1,83 (0,34)	1,79 (0,40)
AE80	5,00 (0,67)	3,46 (0,78)	5,84 (0,82)	2,79 (0,71)	2,43 (0,59)	2,09 (0,69)	2,34 (0,46)
AE160	7,84 (1,10)	10,30 (0,57)	8,40 (1,34)	11,20 (6,06)	11,50 (1,63)	3,06 (0,87)	6,04 (0,84)
ANAE40	0,68 (0,16)	1,65 (0,13)	4,15 (1,10)	1,93 (0,58)	4,89 (0,85)	2,50 (1,04)	3,61 (0,31)
ANAE80	1,19 (0,13)	2,42 (0,39)	4,18 (0,33)	2,30 (0,30)	1,76 (0,87)	1,93 (0,61)	5,34 (0,95)
ANAE160	2,86 (0,50)	8,04 (0,69)	18,70 (1,64)	9,93 (0,62)	3,39 (1,85)	2,01 (1,04)	3,53 (0,72)

**Tabla 6. Microorganismos oligotróficos (R2A).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. La media se representa en la Figura 11.

En el medio ETD (Figura 12) hemos obtenido resultados similares a los encontrados con el medio R2A ya que, en la mayoría de los muestreos, el número de microorganismos oligotróficos totales fue mayor en las muestras tratadas con mayor dosis (AE160 y ANAE160). Sin embargo, a diferencia del análisis con R2A, en los muestreos de octubre de 2008 y junio de 2009 (T4 y T6) el número de microorganismos oligotróficos totales en la muestra control (*Soil*) fue superior al de las muestras de mayor concentración de lodos (Tabla 7 y Figura 12). En las parcelas



tratadas con dosis inferiores ( $40 \text{ t ha}^{-1}$ ) e intermedias ( $80 \text{ t ha}^{-1}$ ), el número de microorganismos oligotróficos fue superior en algunos muestreos respecto a *Soil* (AE40 y AE80: T0, T1, T2 y T3; ANAE40 y ANAE80: T1, T2 y T3) (Tabla 7 y Figura 12).

Aunque los medios de cultivo R2A y ETD son utilizados para el mismo fin, hemos observado diferencias en el recuento de microorganismos oligotróficos entre ambos medios (Figura 11 y Figura 12). En R2A se observó un número inferior de estos microorganismos en la parcela control (*Soil*) respecto a las parcelas tratadas con lodos en algunos muestreos de nuestro estudio, detectando un efecto contrario en ETD. Esa diferencia podría ser atribuida a que la composición de ambos medios es distinta, aunque presumiblemente evaluaron el mismo tipo de microorganismo. Mientras que R2A presenta una composición estandarizada, en la fabricación de ETD se utiliza un extracto de tierra que contiene una composición variable pudiendo influir, por tanto, en la selección de distintos microorganismos oligotróficos.

MUESTRA	ETD ( $\times 10^9$ CFU $\text{g}^{-1}$ suelo)						
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	0,64 (0,09)	0,49 (0,06)	0,73	0,41 (0,12)	10,50 (1,73)	1,54 (0,50)	5,86 (0,22)
AE40	0,81 (0,10)	1,65 (0,23)	1,17 (0,07)	1,46 (0,16)	2,26 (0,54)	0,88 (0,06)	0,62 (0,05)
AE80	6,02 (0,23)	1,43 (0,49)	1,44 (0,16)	1,31 (0,08)	1,72 (0,20)	0,48 (0,06)	1,11 (0,10)
AE160	2,71 (0,10)	5,40 (0,79)	1,50 (0,09)	2,97 (0,22)	4,68 (0,35)	1,46 (0,15)	1,71 (0,50)
ANAE40	0,35 (0,12)	2,37 (0,34)	0,69 (0,01)	1,30 (0,27)	2,83 (0,22)	0,53 (0,06)	1,01 (0,19)
ANAE80	0,50	1,54 (0,26)	1,16 (0,06)	0,86 (0,08)	1,55 (0,33)	0,86 (0,05)	1,61 (0,32)
ANAE160	1,85 (0,14)	11,00(0,74)	4,40 (0,07)	2,75 (0,20)	5,56 (0,72)	1,02 (0,02)	1,19 (0,10)

**Tabla 7. Microorganismos oligotróficos (ETD).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 12.

Respecto al número de microorganismos copiotróficos (medio Agar Actinomicetos) (Figura 13), hemos detectado un patrón semejante al observado en el caso de los microorganismos oligotróficos: un incremento en las parcelas AE160 y ANAE160 principalmente (Tabla 8). En el primer muestreo, de manera similar a los resultados en R2A, no hemos observado diferencias estadísticas en el número de estos microorganismos entre las muestras. En las parcelas tratadas con lodo de depuradora aerobio se observó un mayor número de microorganismos copiotróficos al aumentar la dosis aplicada incluso hasta el último análisis del estudio (junio de 2009 – T6). A este respecto, el lodo aerobio incrementó más el número de microorganismos en el suelo que el lodo anaerobio en algunos muestreos (Tabla 8 y Figura 13). En cuanto a las parcelas tratadas con dosis inferiores e intermedias ( $40$  y  $80 \text{ t ha}^{-1}$ ) hemos detectado un número de microorganismos superior en las tratadas con lodo aerobio en la mayoría de los muestreos respecto a las tratadas con lodo anaerobio (Tabla 8 y Figura 13).

En resumen, las parcelas de suelos agrícolas en las cuales aplicamos lodos de depuradora presentaron un mayor número de microorganismos oligotróficos y copiotróficos que las parcelas sin lodo (*Soil*).

AGAR ACTINOMICETOS ( $\times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> suelo)							
MUESTRA	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	1,42 (0,60)	1,33 (0,11)	2,16 (0,11)	1,43 (0,44)	0,81 (0,11)	0,67 (0,04)	1,46 (0,35)
AE40	2,59 (0,11)	2,73 (0,62)	4,22 (0,66)	2,73 (0,48)	2,87 (0,62)	1,43 (0,18)	1,72 (0,01)
AE80	7,32 (3,02)	7,05 (2,73)	4,15 (0,76)	2,51 (0,43)	2,17 (0,41)	1,48 (0,19)	2,51 (0,32)
AE160	3,49 (1,26)	16,20(3,04)	12,50 (3,70)	7,28 (0,33)	2,52 (0,52)	3,11 (0,33)	5,21 (0,30)
ANAE40	2,33 (0,32)	3,16 (0,80)	3,28 (0,45)	1,43 (0,25)	1,86 (0,35)	1,45 (0,31)	1,76 (0,19)
ANAE80	1,87 (0,15)	5,72 (2,10)	3,28 (0,41)	1,73 (0,24)	2,67 (0,19)	1,34 (0,28)	2,51 (0,32)
ANAE160	15,3 (2,48)	11,50(0,92)	13,50 (1,13)	9,69 (2,28)	3,88 (0,63)	1,64 (0,25)	2,47 (0,54)

**Tabla 8. Microorganismos copiotróficos (Agar Actinomicetos).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 13.

### 2.5.1.3 BACTERIAS Y HONGOS.

Con el fin de determinar si los efectos son más acusados en las poblaciones bacterianas o en las fúngicas, hemos realizado recuentos en medios específicos para cada uno de ellos: para bacterias, R2AC que contiene cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas eucariota, y para hongos, Sabouraud-Cloranfenicol, que contiene cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas bacteriana.

El número de bacterias oligotróficas totales en medio **R2AC** (Tabla 9 y Figura 14) fue superior en las muestras tratadas con mayores dosis (AE160 y ANAE160). Esta diferencia se mantuvo hasta el último muestreo (junio de 2009 – T6) siendo los valores de ANAE160 superiores a los de AE160 en algunos de ellos (T1, T2, T3 y T4). En las parcelas tratadas con menores dosis de lodos el incremento de la población bacteriana sólo ocurrió en los primeros análisis (Tabla 9 y Figura 14).

R2AC ( $\times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> suelo)							
MUESTRA	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	0,99 (0,02)	0,76 (0,41)	1,41 (0,18)	1,17 (0,15)	1,37 (0,31)	0,77 (0,09)	1,52 (0,32)
AE40	1,16 (0,10)	1,91 (0,93)	14,00 (12,1)	2,36 (0,36)	5,45 (0,21)	1,71 (0,10)	1,94 (0,75)
AE80	6,47 (1,41)	1,83 (0,42)	5,77 (2,32)	1,75 (0,12)	3,77 (0,67)	2,41 (0,50)	2,57 (0,21)
AE160	7,79 (1,17)	6,53 (0,80)	8,23 (1,04)	3,44 (0,87)	7,33 (1,13)	2,23 (0,58)	3,14 (0,40)
ANAE40	2,74 (0,14)	2,25 (1,02)	4,15 (1,25)	1,65 (0,24)	3,11 (0,90)	1,93 (0,52)	2,58 (0,75)
ANAE80	1,46 (0,11)	4,51 (0,49)	5,30 (0,92)	2,17 (0,53)	3,36 (0,67)	2,41 (0,70)	6,13 (0,64)
ANAE160	5,79 (0,45)	11,5 (0,35)	17,00 (1,44)	11,40 (2,99)	11,80 (0,50)	2,48 (0,87)	3,64 (0,70)

**Tabla 9. Bacterias oligotróficas (R2AC).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 14.

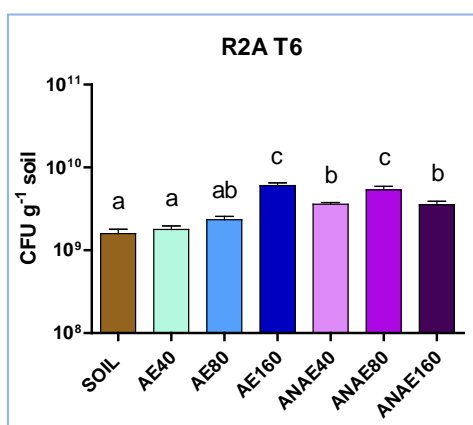
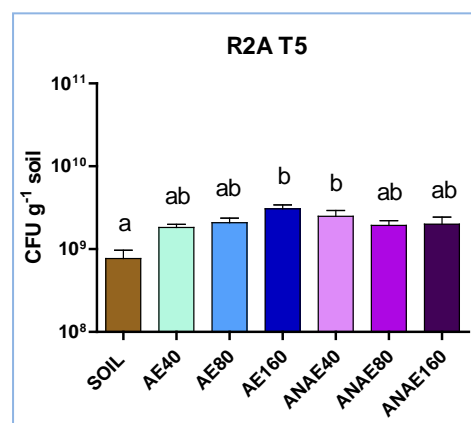
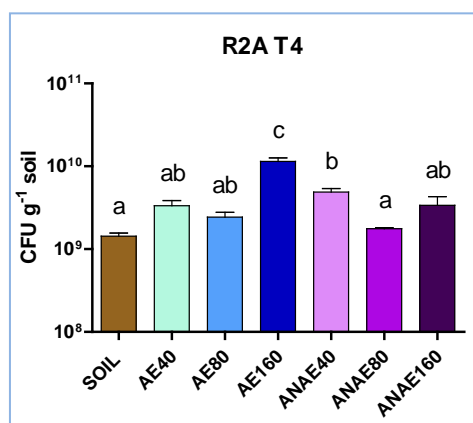
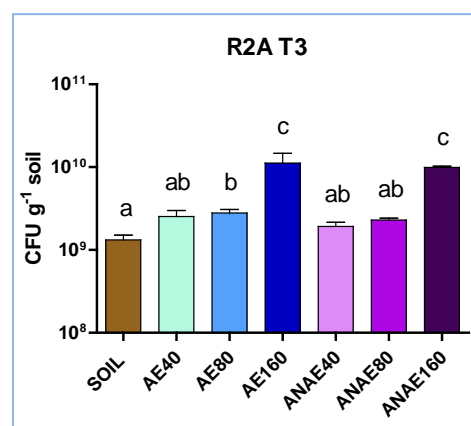
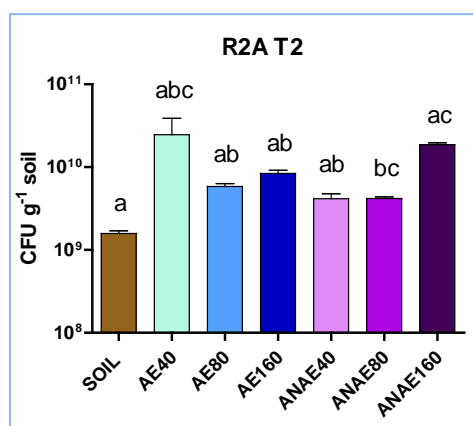
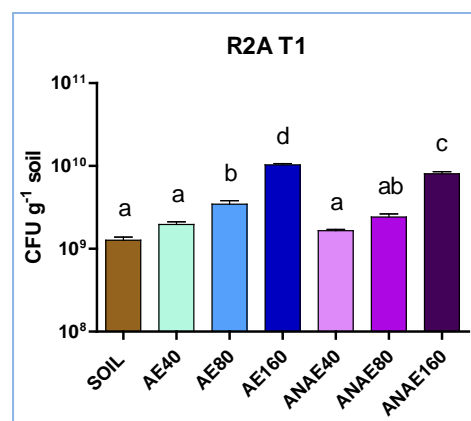
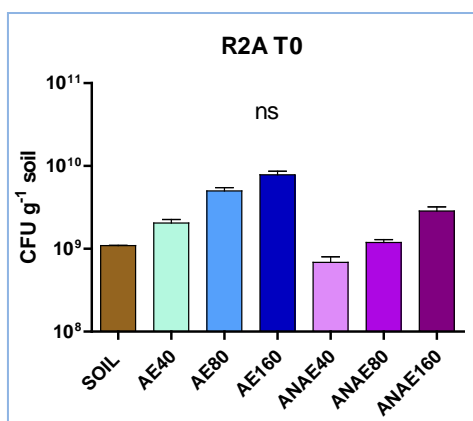
El efecto en la población fúngica fue muy similar al detectado en los anteriores análisis. Como se puede observar en la Figura 15, tras la aplicación de los lodos en los suelos en junio de 2007 (T0), el número de hongos en las parcelas enmendadas fue muy similar al del suelo sin tratar. En cambio, a partir de febrero de 2008 (T2) sí hemos detectado un valor superior de estos microorganismos en las muestras tratadas con lodo aerobio respecto a *Soil*, principalmente en las que se aplicaron 80 y 160 t ha<sup>-1</sup> (AE80 y AE160) llegando incluso, a ser un orden de magnitud

mayor en la mayoría de los análisis en AE160 (T2, T3, T4, T5, T6) (Tabla 10 y Figura 15). En algunos muestreos (T2, T3, T6), el número de hongos fue similar entre la parcela AE80 y AE160 (Tabla 10 y Figura 15). En cuanto a las parcelas tratadas con mayores dosis de lodo anaerobio (ANAE160), el número de hongos solo fue mayor en algunos muestreos (T4 y T6). Sin embargo, los valores en ANAE160 fueron siempre inferiores respecto a AE160 (Tabla 10 y Figura 15). En las muestras tratadas con dosis menores e intermedias se observó un mayor número de hongos en algunos muestreos.

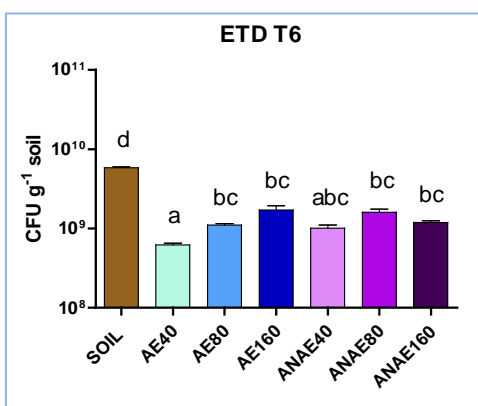
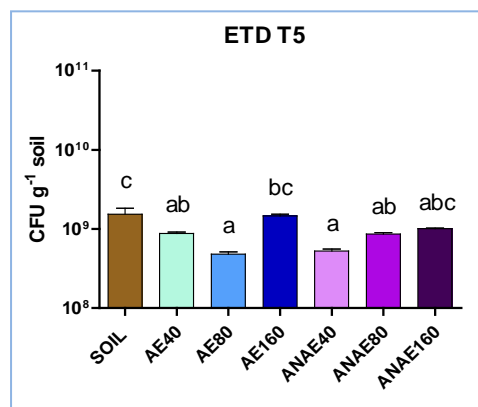
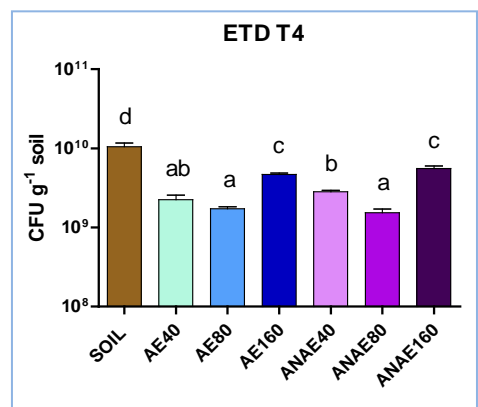
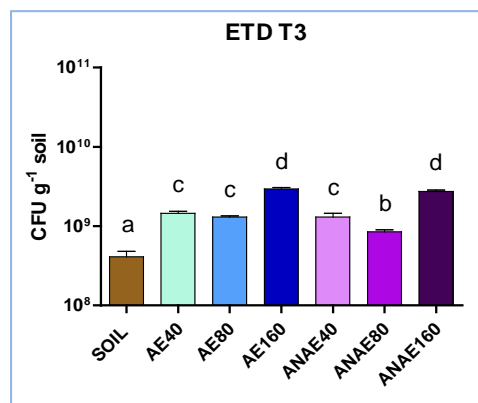
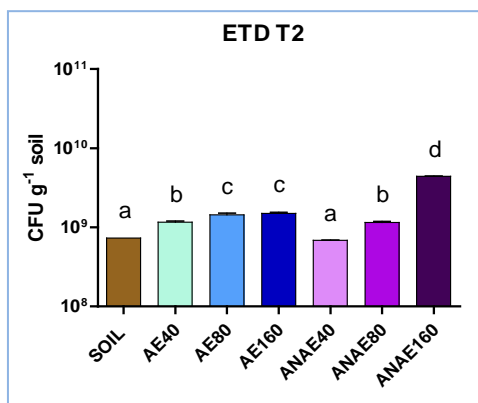
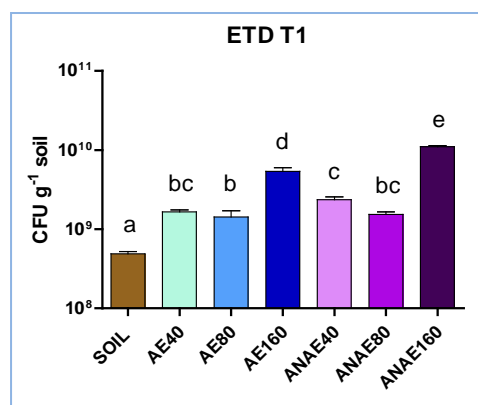
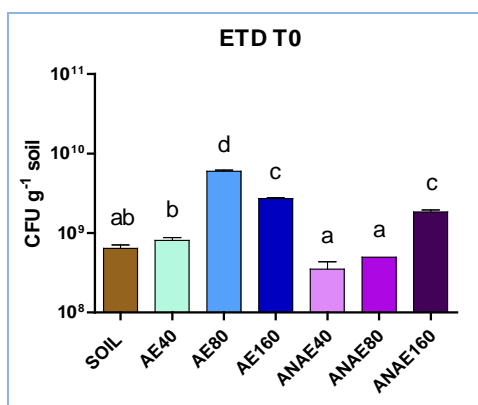
Parece existir una relación entre el incremento del número de hongos y el tipo de residuo utilizado en el estudio. El aumento de la población de estos microorganismos pareció estar más fuertemente relacionado con aplicación de lodo aerobio, principalmente en aquellas tratadas con mayores dosis y ese patrón fue observado hasta el último muestreo en junio de 2009 (T6).

MUESTRA	SABOURAUD CLORANFENICOL ( $\times 10^6$ CFU g <sup>-1</sup> suelo)					
	T0	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	0,56 (0,08)	5,26 (2,30)	3,11 (0,23)	2,53 (0,46)	1,97 (0,16)	3,80 (1,35)
AE40	0,69 (0,14)	4,60 (0,94)	3,12 (0,27)	1,80 (0,30)	2,17 (1,61)	2,83 (1,22)
AE80	0,62 (0,25)	11,50 (1,87)	19,90 (6,92)	3,93 (0,87)	4,12 (2,64)	22,50 (4,30)
AE160	0,79 (0,05)	9,37 (1,06)	27,60 (3,76)	49,10 (16,90)	22,10 (8,13)	26,40 (7,06)
ANAE40	1,09 (0,44)	3,65 (0,93)	1,91 (0,15)	2,02 (0,60)	1,91 (0,57)	2,35 (0,43)
ANAE80	0,43 (0,02)	3,24 (0,55)	7,41 (3,05)	1,33 (0,23)	3,42 (1,04)	20,60 (7,09)
ANAE160	0,80 (0,20)	5,26 (0,47)	7,10 (5,48)	9,57 (2,19)	4,26 (0,23)	14,60 (3,71)

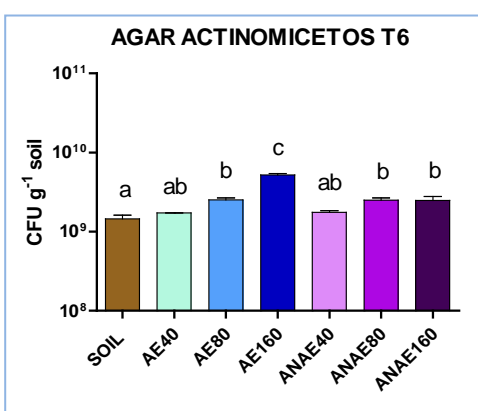
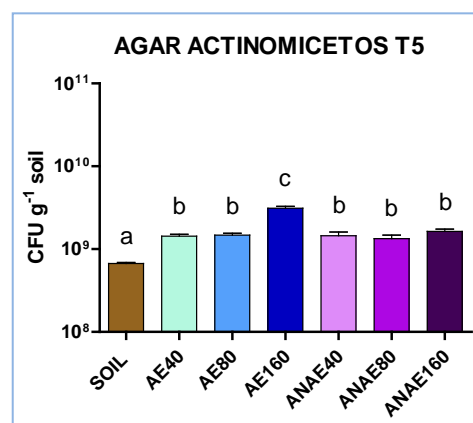
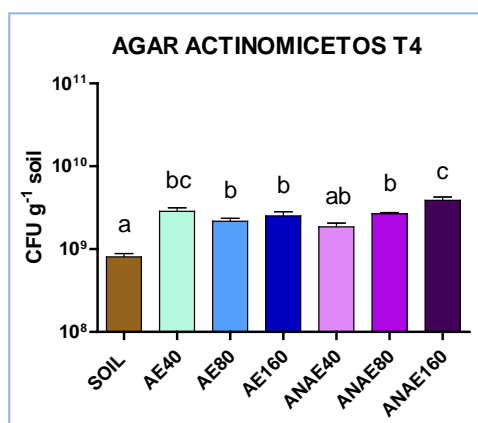
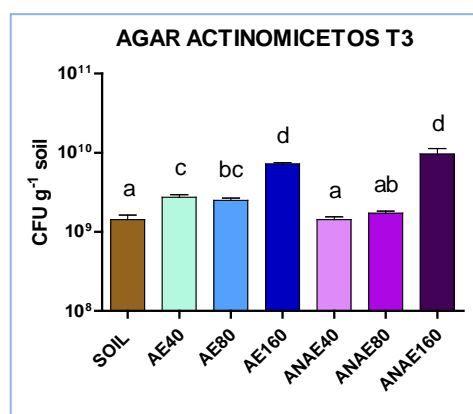
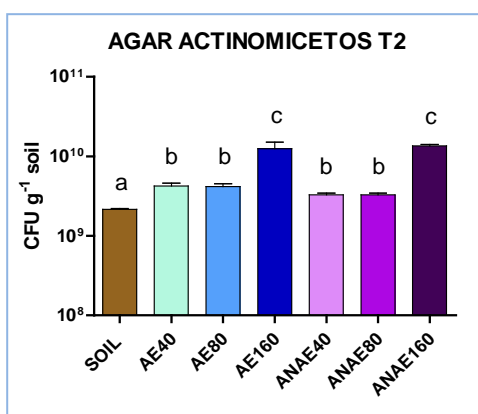
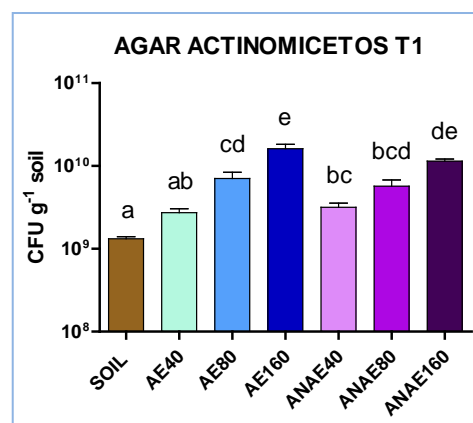
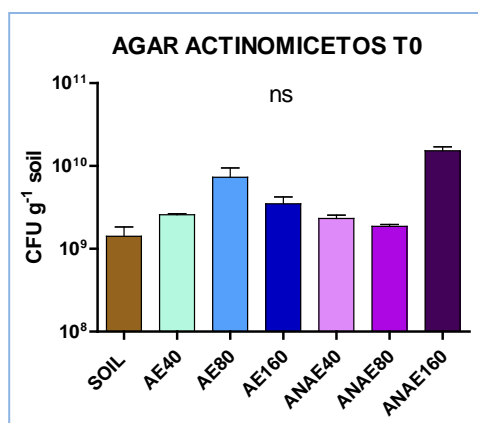
**Tabla 10. Hongos (Sabouraud Cloranfenicol).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 15. No se realizaron recuentos de hongos en octubre de 2007 – T1.



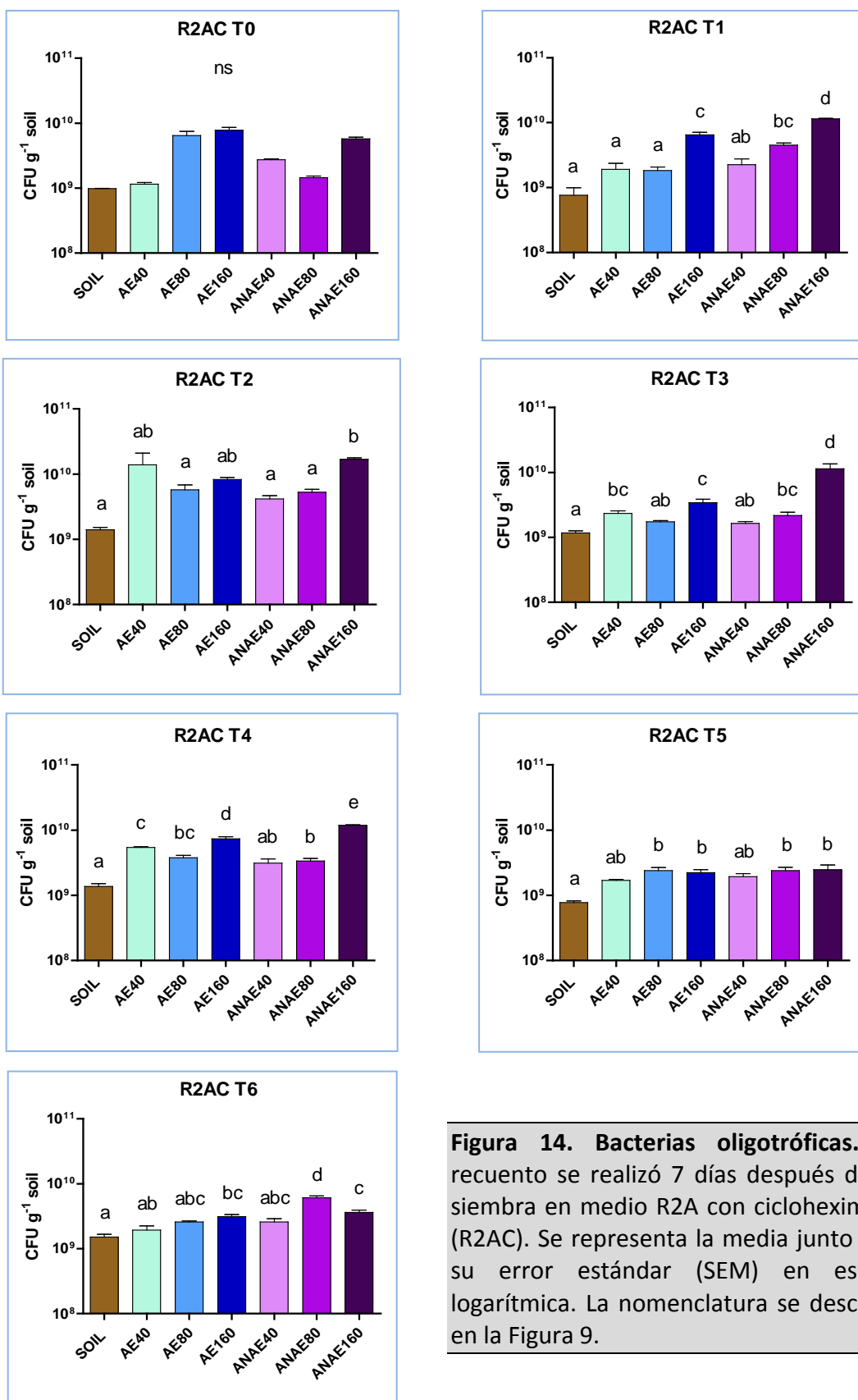
**Figura 11. Microorganismos oligotróficos.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio R2A. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9. *ns*, no significativo a  $p \leq 0,05$ .



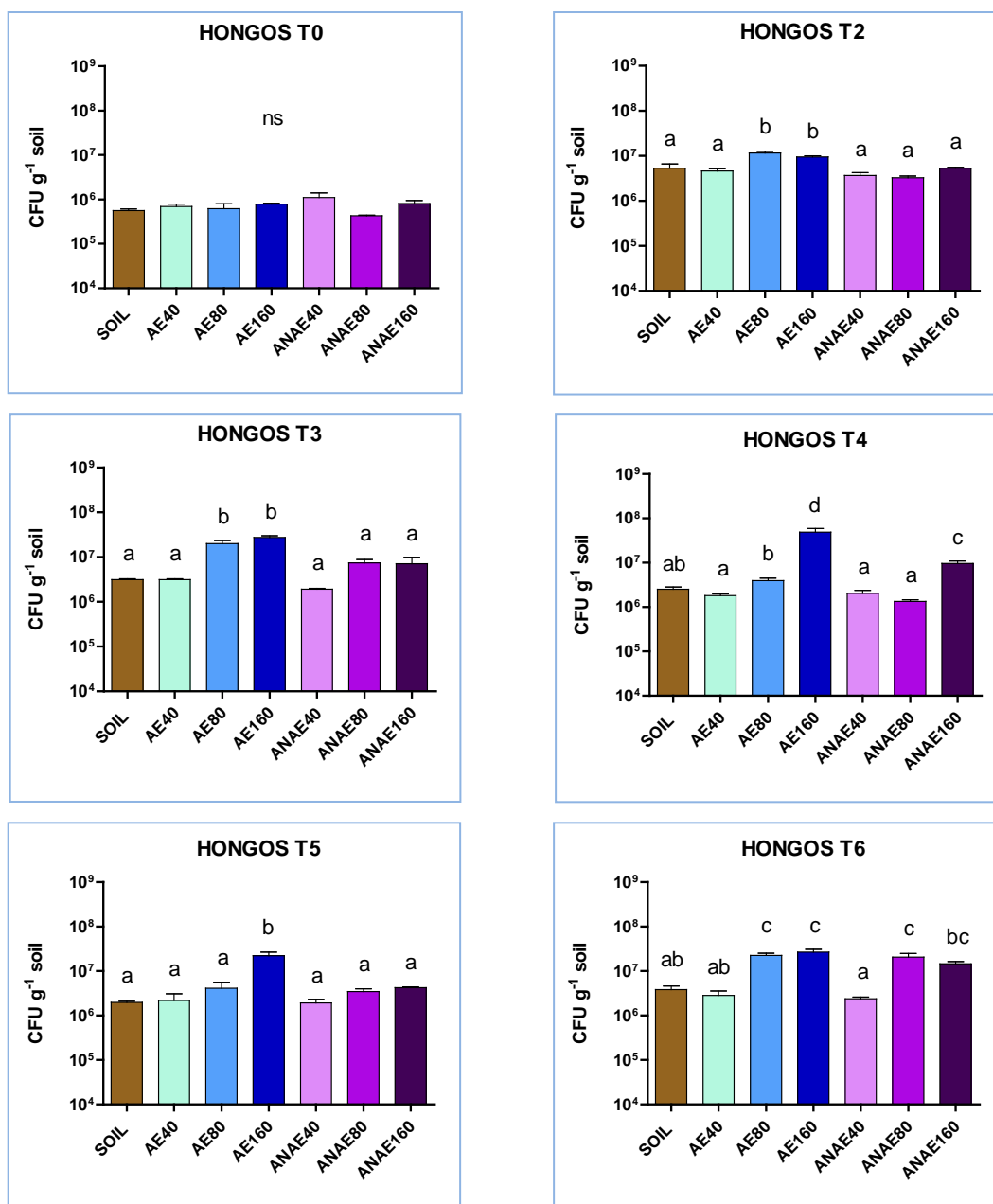
**Figura 12. Microorganismos oligotróficos.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio Extracto de Tierra Diluido (ETD). Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 13. Microorganismos copiotróficos.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio Agar Actinomicetos. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 14. Bacterias oligotróficas.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio R2A con cicloheximida (R2AC). Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 15. Hongos.** El recuento se realizó tras 4 días de incubación en medio Sabouraud Cloranfenicol a 24°C. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. No se realizaron recuentos de hongos en octubre de 2007 – T1. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



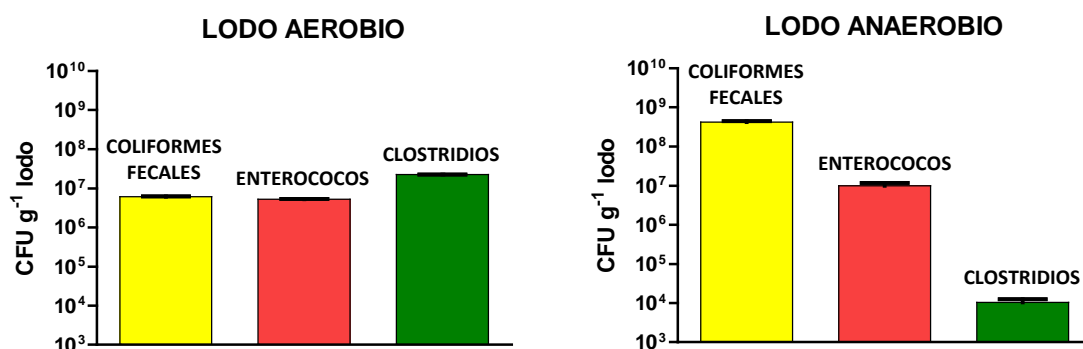
## 2.5.2 EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS ANALIZADOS.

La presencia de patógenos en los lodos de depuradora utilizados como enmiendas en suelos agrícolas comienza a convertirse en una gran preocupación debido a la posibilidad de contaminación de acuíferos y cultivos (Pepper *et al.*, 2008). Los patógenos que se analizaron, así como la metodología utilizada, fueron los indicados en la legislación para aguas potables para el ser humano (BOE de 21 de febrero de 2003, Real Decreto 140/2003). En concreto, se analizó la presencia de coliformes, enterococos y clostridios sulfitorreductores.

### 2.5.2.1 PRESENCIA DE PATÓGENOS EN LOS LODOS UTILIZADOS.

El análisis de los lodos suministrados por el Canal de Isabel II permitió detectar la existencia de cantidades apreciables de bacterias patógenas entéricas. Como se muestra en la Figura 16, las cantidades de estos microorganismos fueron distintas entre los dos tipos de lodos. En el lodo aerobio existió un valor superior de clostridios mientras que en el lodo anaerobio, los patógenos predominantes fueron los coliformes fecales (Figura 16).

Hemos comprobado que el número de coliformes fecales sobrepasó el nivel máximo permitido por la Agencia de Protección Ambiental norteamericana (hasta  $2 \times 10^6$  NMP  $g^{-1}$  lodo seco) en los lodos de depuradora utilizados como enmiendas agrícolas, siendo superior en dos órdenes de magnitud en el **lodo anaerobio** (**anaerobio**:  $4,16 \times 10^8 (\pm 0,382)$ ; **aerobio**:  $6,04 \times 10^6 (\pm 0,163)$ ) (Figura 16).



**Figura 16. Patógenos entéricos detectados en los lodos de depuradora aplicados a las parcelas del estudio.** Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica.

### 2.5.2.2 COLIFORMES EN LOS SUELOS.

El número de coliformes fecales se incrementó en las parcelas tratadas con lodo tras su aplicación en junio de 2007 (T0) (Figura 17), a excepción de ANAE80, siendo más evidente en las muestras tratadas con lodo anaerobio. Además, el número

de coliformes fecales detectados en las muestras ANAE40 y ANAE160 en junio de 2007 – T0, sobrepasó el límite permitido en lodos de depuradora por la EPA ( $2 \times 10^6$  NMP g<sup>-1</sup> de lodo seco) (Tabla 11 y Figura 17). El número de coliformes fecales disminuyó en las muestras del estudio a lo largo del tiempo y en algunas, incluso, desapareció (en AE40 y en *Soil* en febrero de 2008 - T2) (Tabla 11 y Figura 17). Un año después de la aplicación de los lodos, observamos aún la presencia de coliformes fecales principalmente en las muestras tratadas con mayor dosis de lodo (AE160 y ANAE160) (Figura 17).

No obstante, hemos detectado una disminución del número de esas bacterias en los últimos muestreos del estudio, no existiendo diferencias apreciables entre las parcelas (Tabla 11 y Figura 17) y llegando, incluso, a la completa desaparición en algunas parcelas a partir del muestreo de octubre de 2008 (T4) (AE40 y *Soil*). Sin embargo, en el último muestreo (junio de 2009 - T6) todavía fue posible detectar coliformes fecales en AE80, AE160, ANAE80 y ANAE160, aunque los valores no sobrepasaron el máximo permitido en lodos por la Agencia de Protección Ambiental norteamericana (Tabla 11 y Figura 17).

TTC ( $\times 10^5$ CFU g <sup>-1</sup> suelo)							
MUESTRA	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	0,26 (0,007)	3,05 (0,54)	-	2,47 (1,07)	-	-	-
AE40	3,44 (0,94)	1,25	-	8,49 (1,02)	0,96	-	-
AE80	2,59 (0,08)	0,11	0,49	1,37 (0,34)	0,05	0,05	0,27 (0,08)
AE160	0,68	2,32 (1,64)	1,79 (0,53)	8,02 (0,90)	1,00	0,15 (0,13)	0,59
ANAE40	93,60 (0,85)	0,40	0,58 (0,40)	2,84 (0,71)	0,40	-	-
ANAE80	0,02	17,3 (8,20)	0,06	2,64 (0,51)	0,30	-	0,05
ANAE160	97,70 (0,85)	5,25 (0,83)	1,31 (0,80)	26,5 (5,37)	0,05	-	0,54

**Tabla 11. Coliformes fecales (TTC).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 17. En SOIL, AE40, ANAE40, ANAE80 y ANAE160 no se detectaron coliformes fecales en algunos análisis. Los números de coliformes fecales que sobrepasaron el valor permitido en lodos por la US EPA, están destacados en color verde.

### 2.5.2.3 ENTEROCOCOS EN LOS SUELOS

Tras la aplicación de los lodos de depuradora, en el muestreo de junio de 2007 (T0), el número de enterococos fue superior en las parcelas enmendadas (Tabla 12 y Figura 18). El incremento fue más patente en las muestras tratadas con mayor dosis de lodo (AE160 y ANAE160) y en la mayor parte de los muestreos. En la parcela control (*Soil*) detectamos enterococos en casi todos los muestreos excepto en febrero de 2008 (T2), aunque casi siempre los valores son inferiores respecto a los hallados en las muestras tratadas con lodos (Tabla 12 y Figura 18). En el último muestreo del estudio (junio de 2009 - T6), hemos observado todavía la presencia de enterococos en algunas de las parcelas (también en *Soil*) y el número de estos microorganismos fue superior en incluso un orden de magnitud en las parcelas AE160, ANAE40 y ANAE80 (Tabla 12 y Figura 18).

En resumen, el número de enterococos disminuyó con el tiempo y en algunas parcelas, incluso, desapareció en algún análisis (*Soil*, AE40, AE80, AE160, ANAE80) (Tabla 12 y Figura 18) mostrando así, un comportamiento similar al observado para el caso de los coliformes fecales, aunque en líneas generales, el número de enterococos detectado fue superior al de coliformes fecales en *Soil* (Figura 17 y Figura 18).

BILIS ESCULINA ( $\times 10^4$ CFU $g^{-1}$ suelo)							
MUESTRA	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	0,17 (0,04)	8,23 (2,27)	-	0,78 (0,07)	0,01 (0,007)	0,02	0,13 (0,03)
AE40	79,90 (6,29)	85,00 (1,56)	3,11 (0,75)	0,53	2,28 (0,25)	-	0,09
AE80	64,70 (4,67)	4,05 (1,01)	3,98 (0,82)	0,21 (0,15)	0,20	-	-
AE160	101,0 (11,00)	27,10 (5,02)	27,00 (2,05)	0,29 (0,16)	0,93 (0,06)	-	1,66 (0,49)
ANAE40	6,55 (2,27)	6,57 (2,87)	5,75 (1,17)	0,45 (0,43)	0,10	0,06	1,07
ANAE80	3,95 (0,47)	2,93 (0,71)	1,37 (0,76)	1,57 (0,44)	0,19	-	1,60 (0,32)
ANAE160	83,90 (3,73)	20,30 (0,21)	23,20 (1,80)	2,29 (0,55)	0,57 (0,07)	0,33 (0,22)	0,11

**Tabla 12. Enterococos (*Bilis esculina*).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 18. En algunos muestreos no se detectaron enterococos.

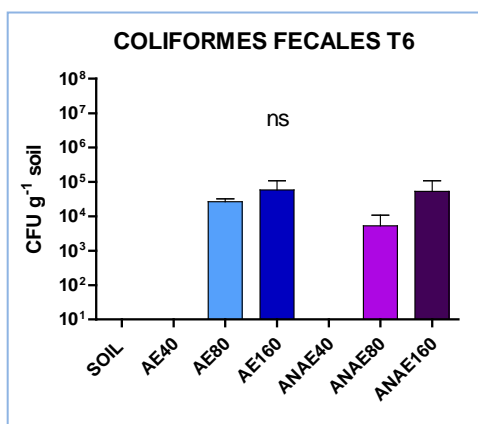
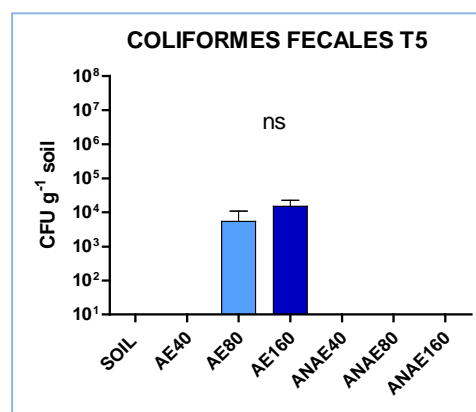
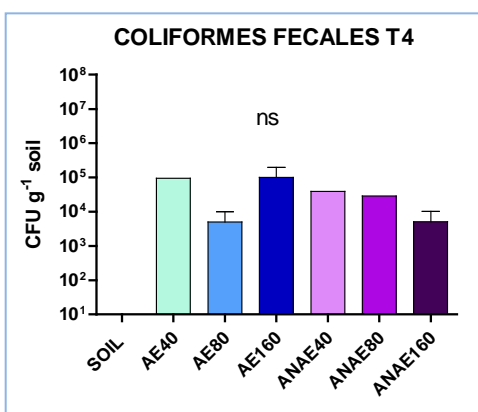
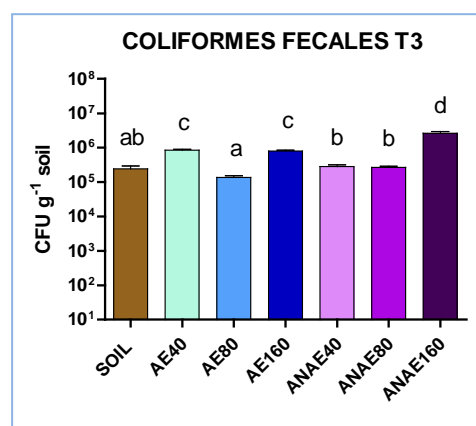
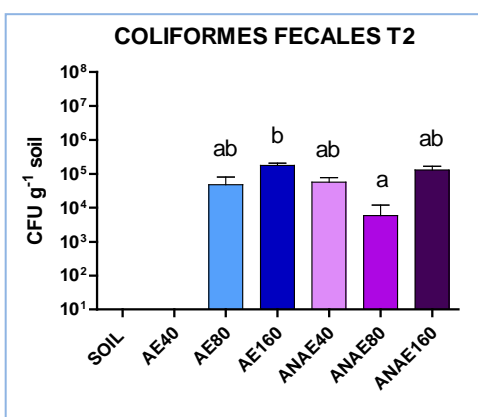
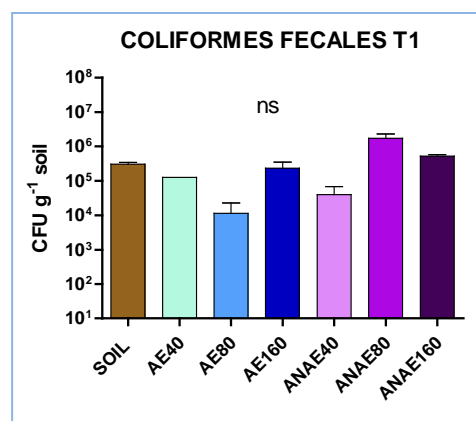
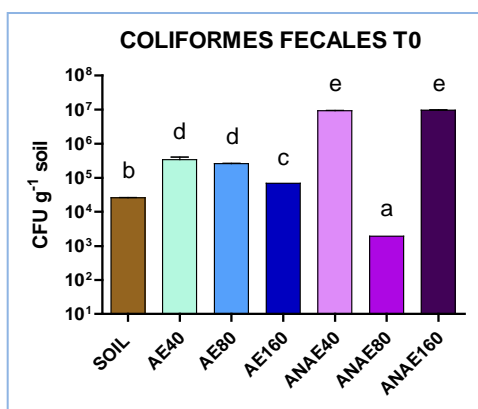
#### 2.5.2.4 CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES EN LOS SUELOS

La cantidad de clostridios sulfitorreductores en las parcelas enmendadas con lodo fue superior a la del suelo control en junio de 2007 (T0) aunque los valores no fueron estadísticamente significativos (Tabla 13 y Figura 19). Los siguientes análisis pusieron de manifiesto un incremento en la población de clostridios en todas las parcelas enmendadas (Tabla 13 y Figura 19). Se observó principalmente un número superior de clostridios sulfitorreductores en las parcelas tratadas con lodo anaerobio en casi todos los muestreos respecto a los demás tratamientos (principalmente en ANAE160 en T0, T3 y T5). En la parcela de suelo agrícola control (*Soil*) hemos detectado un ligero aumento del número de clostridios en algunos muestreos (T0, T2, T3 y T6) (Tabla 13 y Figura 19).

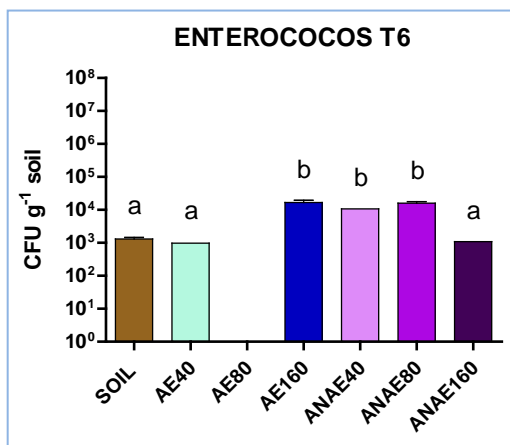
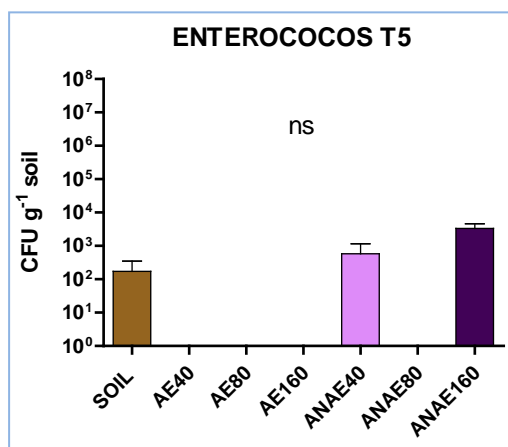
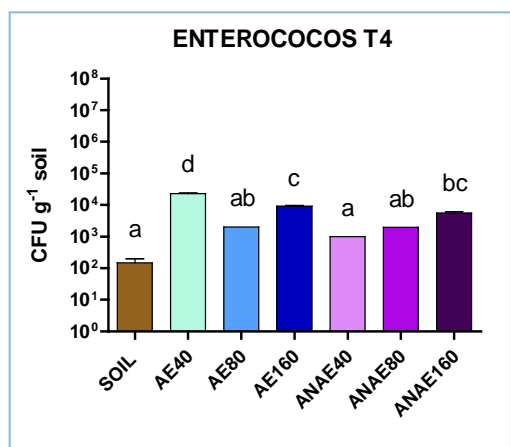
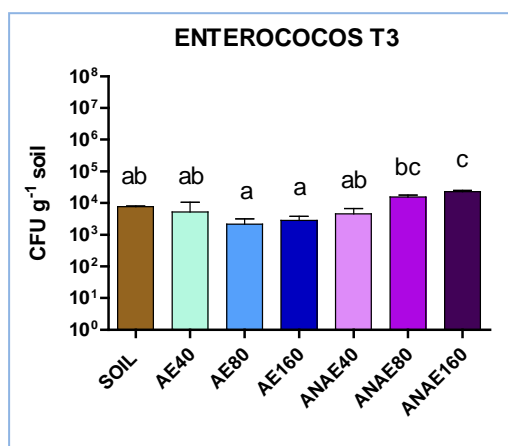
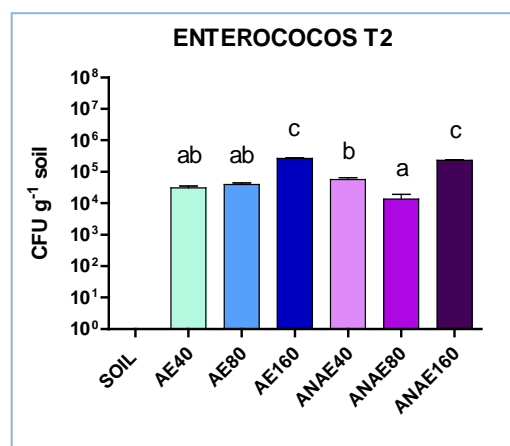
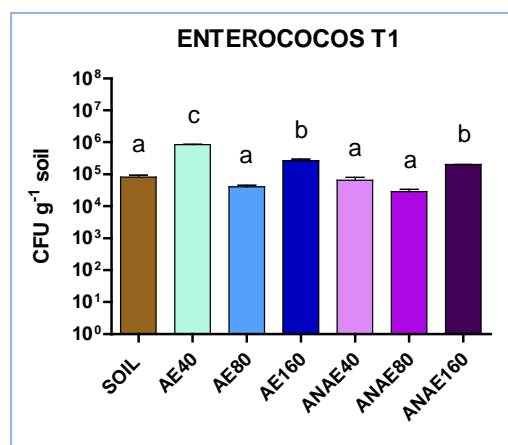
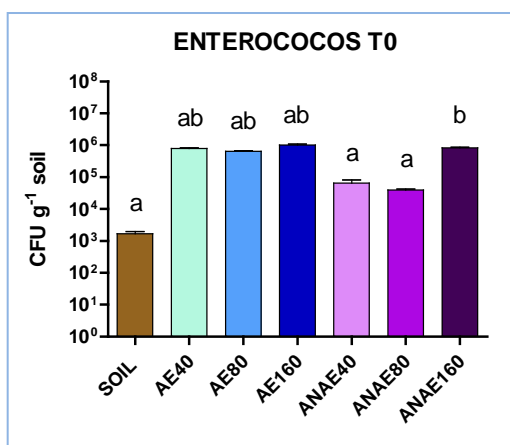
HIERRO SULFITO ( $\times 10^5$ CFU $g^{-1}$ suelo)						
MUESTRA	T0	T1	T2	T3	T5	T6
SOIL	0,50 (0,08)	0,001	0,21 (0,06)	0,32 (0,05)	0,08 (0,003)	0,28 (0,12)
AE40	2,23 (0,57)	0,001	0,63	1,02 (0,33)	8,12 (0,76)	0,45 (0,05)
AE80	44,70 (10,40)	0,001	0,91 (0,63)	0,35 (0,07)	6,84 (0,38)	2,21 (1,10)
AE160	33,00	0,01 (0,01)	1,21 (0,50)	1,39 (0,41)	10,90 (2,74)	1,52 (0,75)
ANAE40	1,82 (0,08)	0,005	2,48 (0,25)	2,51 (0,16)	7,75 (0,33)	4,45 (1,29)
ANAE80	3,28 (1,63)	0,01 (0,01)	4,45 (0,25)	2,19 (1,58)	12,30 (2,97)	16,20 (0,85)
ANAE160	38,60 (1,77)	0,01 (0,002)	4,24 (0,14)	14,00	14,90 (0,07)	4,11

**Tabla 13. Clostridios sulfitorreductores (Hierro Sulfito).** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 19. No se realizaron recuentos de clostridios sulfitorreductores en octubre de 2008 – T4.

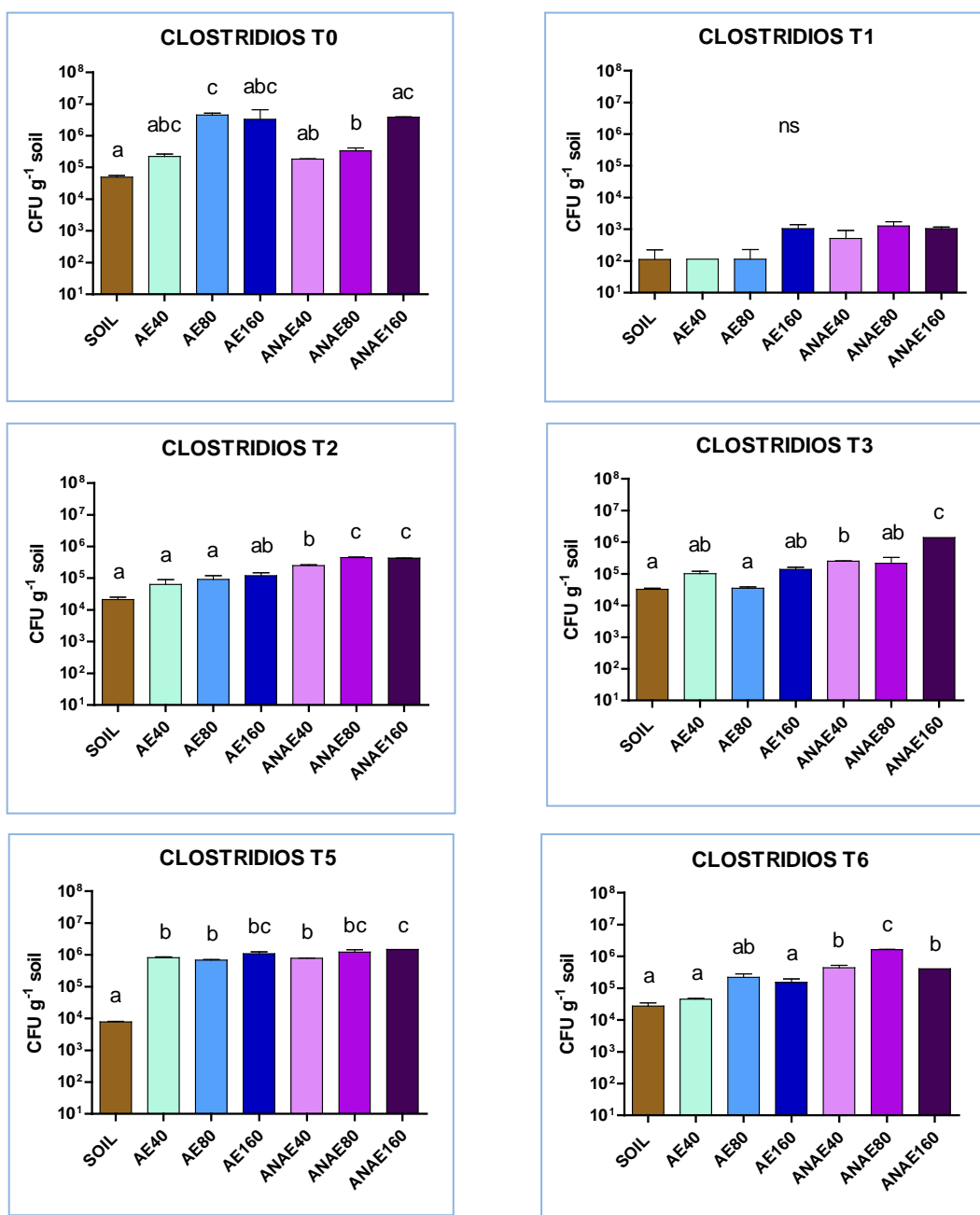
En el último análisis (junio de 2009 - T6) hemos detectado que el número de clostridios en las parcelas tratadas con lodo anaerobio (principalmente en ANAE160), fue todavía superior respecto a *Soil* (Tabla 13 y Figura 19). En las muestras de suelo tratadas con lodo aerobio hemos observado un menor incremento en la población de esas bacterias respecto al suelo control que el equivalente entre las parcelas tratadas con lodo anaerobio y *Soil* (Tabla 13 y Figura 19).



**Figura 17. Coliformes fecales.** El recuento se realizó tras 48 horas de incubación en medio TTC a 44°C. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 18. Enterococos.** El recuento se realizó tras 48 horas de incubación en medio Slanetz-Bartley a 37°C y posteriormente, se confirmó en medio Bilis Esculina Azida. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 19. Clostridios sulfitoreductores.** El recuento se realizó tras 48 horas de incubación en medio Hierro Sulfito a 37°C. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. No se realizaron recuentos de clostridios sulfitoreductores en octubre de 2008 – T4. La nomenclatura se describe en la Figura 9.

### 2.5.3 INFLUENCIA DE LOS LODOS DE DEPURADORA EN LA MICROBIOTA DE BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA DE LOS SUELOS.

Los lodos de depuradora urbana están compuestos principalmente por excretas humanas. Con la generalización del uso de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, es frecuente que se encuentren presentes residuos de éstos junto con bacterias resistentes a antibióticos en los LDAR (Hölzel *et al.*, 2010). La utilización de los lodos como fertilizantes en suelos agrícolas podría contaminar los cultivos y/o acuíferos, y afectar gravemente a la salud humana y animal. Además, la presencia de estos residuos de antibióticos en los LDAR puede estar alterando la microbiota autóctona del mismo.

Por esta razón, hemos determinado el perfil de resistencia a ampicilina en los suelos analizados. Para ello, hemos comprobado la presencia de bacterias resistentes a ampicilina utilizando la concentración de  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina como valor de corte para detectar resistencia a este antibiótico, según indica el *Clinical Laboratory Standards Institution* - CLSI (Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19., 2009).

En el análisis inicial de los lodos hemos comprobado que la cantidad de bacterias resistentes a  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina fue superior en el lodo aerobio ( $1,38 \times 10^9 \pm 0,183 \text{ CFU g}^{-1}$  lodo) en comparación con lo encontrado en el lodo anaerobio ( $6,40 \times 10^8 \pm 1,67 \text{ CFU g}^{-1}$  lodo). En la parcela control (*Soil*) el número de esas bacterias fue similar en casi todos los análisis, con una ligera disminución en los muestreos T3, T5 y T6 (Tabla 14 y Figura 20).

Tras la adición de los lodos a las parcelas, hemos detectado que el número de bacterias resistentes a  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina fue similar en casi todas las muestras, a excepción de ANAE160 que presentó un valor superior (Tabla 14 y Figura 20). Posteriormente, en los siguientes análisis, el número de esas bacterias fue superior en las parcelas enmendadas, especialmente en aquellas tratadas con la mayor dosis de lodo (AE160 y ANAE160), incluso dos años después de la aplicación de los lodos (Tabla 14 y Figura 20). En las muestras tratadas con dosis menores e intermedias de lodos (principalmente en las tratadas con lodo aerobio), el número de bacterias resistentes a  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina también fue superior respecto a *Soil* (Tabla 14 y Figura 20).

R2AC $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina ( $\times 10^8 \text{ CFU g}^{-1}$ suelo)							
MUESTRA	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	2,42 (0,63)	2,57 (0,46)	2,79 (0,57)	1,26 (0,08)	2,26 (0,10)	1,23 (0,04)	1,30 (0,28)
AE40	1,29 (0,09)	9,89 (1,77)	8,88 (1,04)	9,19 (1,24)	20,40 (1,87)	5,36 (0,08)	3,00 (0,23)
AE80	7,27 (2,55)	9,57 (2,50)	12,30 (2,97)	10,80 (4,20)	18,70 (3,04)	8,49 (0,23)	7,35 (0,86)
AE160	2,22 (1,15)	17,90 (1,00)	17,40 (3,07)	18,90 (2,56)	25,40 (2,35)	10,20 (0,07)	14,00 (3,45)
ANAE40	1,47 (0,01)	6,63 (1,57)	8,36 (1,80)	4,87 (0,74)	19,70 (0,75)	5,38 (0,25)	4,34 (1,88)
ANAE80	1,58	12,30 (1,13)	8,46 (3,31)	4,41 (1,14)	13,00 (1,34)	8,18 (0,16)	10,70 (2,64)
ANAE160	2,75 (0,11)	16,00 (2,48)	19,80 (2,77)	12,90 (3,97)	12,90 (1,57)	16,70 (1,06)	6,64 (4,29)

**Tabla 14. Bacterias resistentes a  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina.** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 20.



Con el objetivo de comprobar cómo era este nivel de resistencia, hemos utilizado  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ampicilina en R2AC (Tabla 15 y Tabla 16) (Figura 21 y Figura 22). El número de bacterias resistentes a  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina fue muy similar al de  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ , siendo superior en las parcelas tratadas con mayores dosis (AE160 y ANAE160). Las parcelas tratadas con lodo aerobio presentaron valores ligeramente superiores de bacterias resistentes a  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  respecto a las otras muestras (Tabla 15 y Figura 21).

En cambio, cuando se utilizó  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ampicilina, solamente hemos detectado un incremento del número de esas bacterias resistentes en junio de 2008 (T3), especialmente en las muestras tratadas con mayores dosis de lodo (Tabla 16 y Figura 22). En los siguientes muestreos del estudio (T4, T5 y T6) (Tabla 16 y Figura 22) no hemos apreciado diferencias claras, disminuyendo posteriormente su número en todas las parcelas (en T5 y T6).

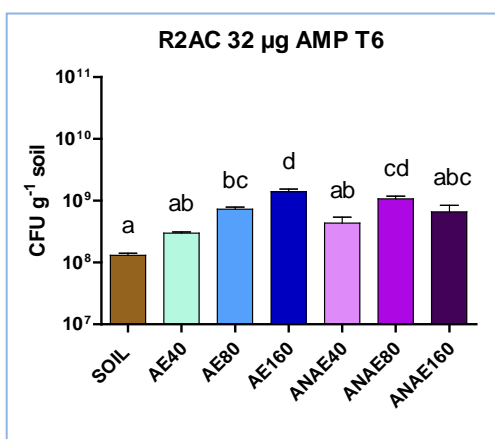
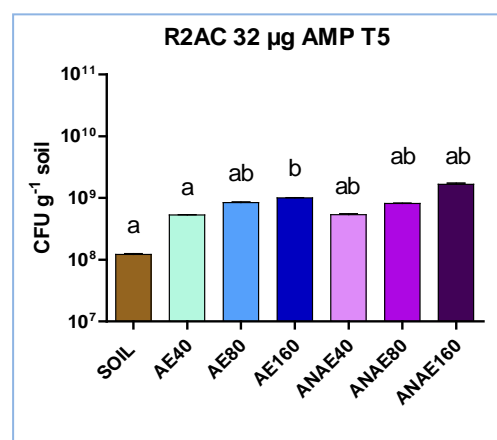
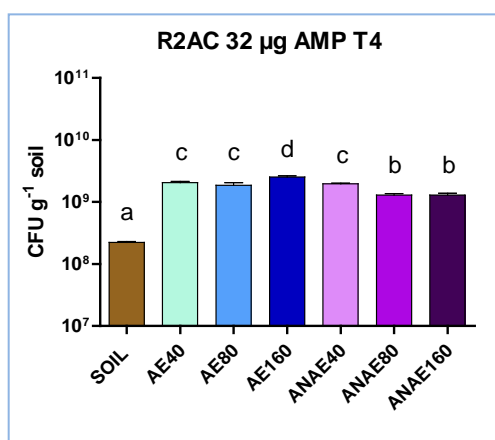
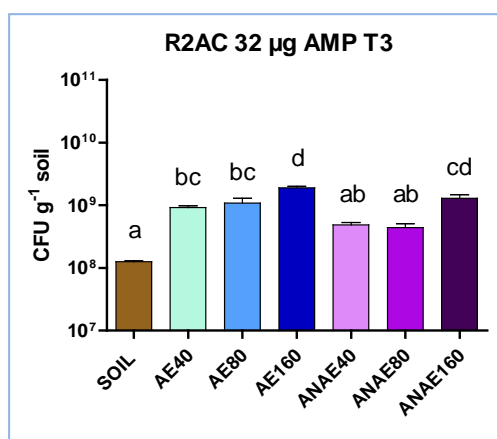
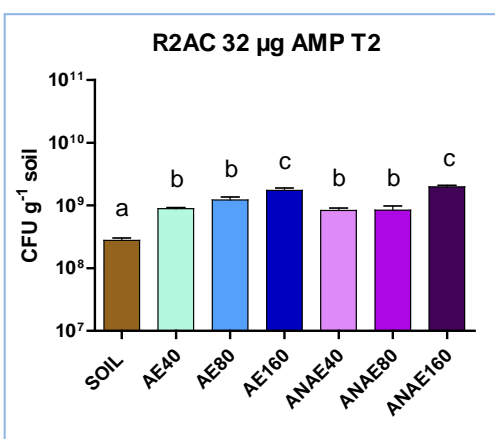
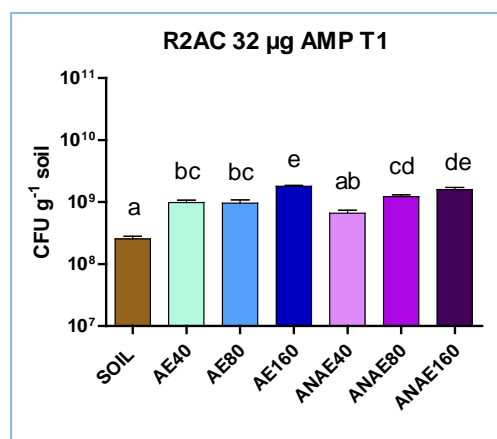
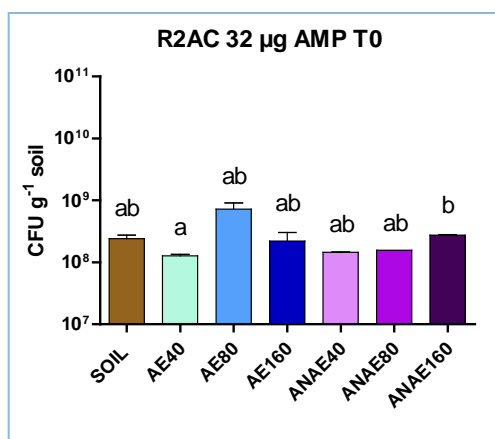
Analizando la resistencia bacteriana a ampicilina conjuntamente, se puede concluir que el tratamiento con lodo aerobio incrementó el número de bacterias resistentes en la mayoría de los muestreos del estudio (Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16) (Figura 20, Figura 21 y Figura 22).

R2AC $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina ( $\times 10^8$ CFU $\text{g}^{-1}$ suelo)					
MUESTRA	T2	T3	T4	T5	T6
SOIL	2,36 (0,43)	1,04 (0,10)	1,73 (0,64)	0,33 (0,02)	0,63 (0,04)
AE40	7,13 (1,62)	6,23 (0,96)	12,50 (1,55)	4,26 (0,13)	1,66 (0,26)
AE80	7,74 (0,76)	8,89 (0,38)	11,20 (0,40)	3,39 (0,40)	5,81 (1,05)
AE160	15,50 (1,68)	19,40 (6,52)	25,20 (5,76)	4,90 (0,08)	8,24 (0,40)
ANAE40	6,21 (0,50)	6,21 (0,50)	18,00 (1,32)	3,12 (1,21)	3,67 (0,90)
ANAE80	4,86 (1,25)	5,65 (1,66)	9,99 (1,70)	5,45 (1,07)	8,09 (0,55)
ANAE160	15,60 (1,49)	10,00 (3,90)	15,40 (9,32)	5,81 (0,83)	4,19 (1,68)

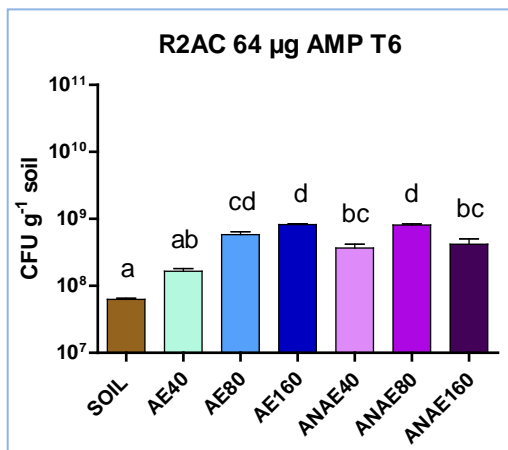
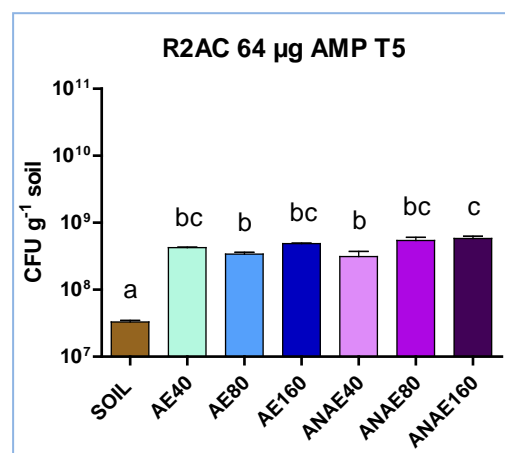
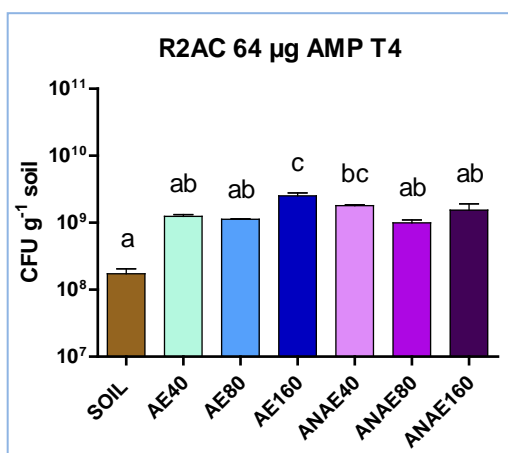
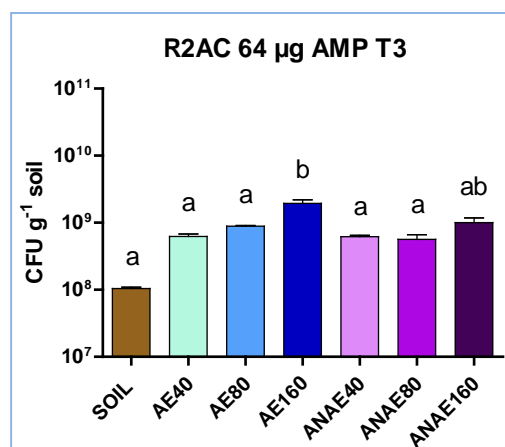
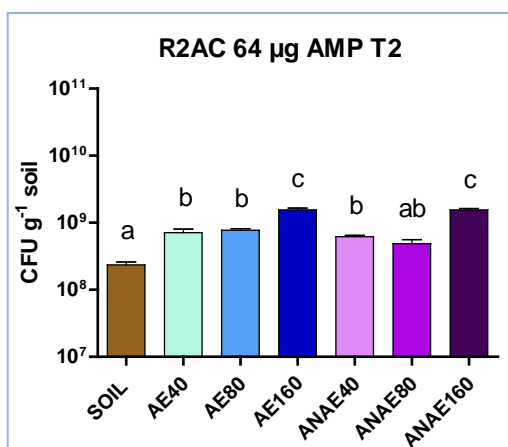
**Tabla 15. Bacterias resistentes a  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina.** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 21. Los recuentos de bacterias resistentes a  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina se realizaron a partir de febrero de 2008 (T2).

R2AC $1 \text{ g L}^{-1}$ ampicilina ( $\times 10^6$ CFU $\text{g}^{-1}$ suelo)				
MUESTRA	T3	T4	T5	T6
SOIL	14,40 (4,28)	4,92 (3,85)	4,34 (0,41)	4,84 (0,20)
AE40	51,00 (16,0)	15,00 (3,29)	5,96 (0,77)	5,86 (0,98)
AE80	72,00 (9,90)	13,00 (7,00)	29,50 (27,00)	16,90 (10,30)
AE160	171,00 (44,60)	10,90 (3,97)	14,70 (4,74)	15,80 (0,80)
ANAE40	44,10 (7,06)	5,29 (0,57)	5,20 (4,09)	4,81 (0,80)
ANAE80	68,20 (18,70)	13,00 (4,82)	23,00 (4,17)	18,90 (8,57)
ANAE160	118,00 (31,80)	9,60 (2,13)	14,40 (2,95)	13,60 (0,80)

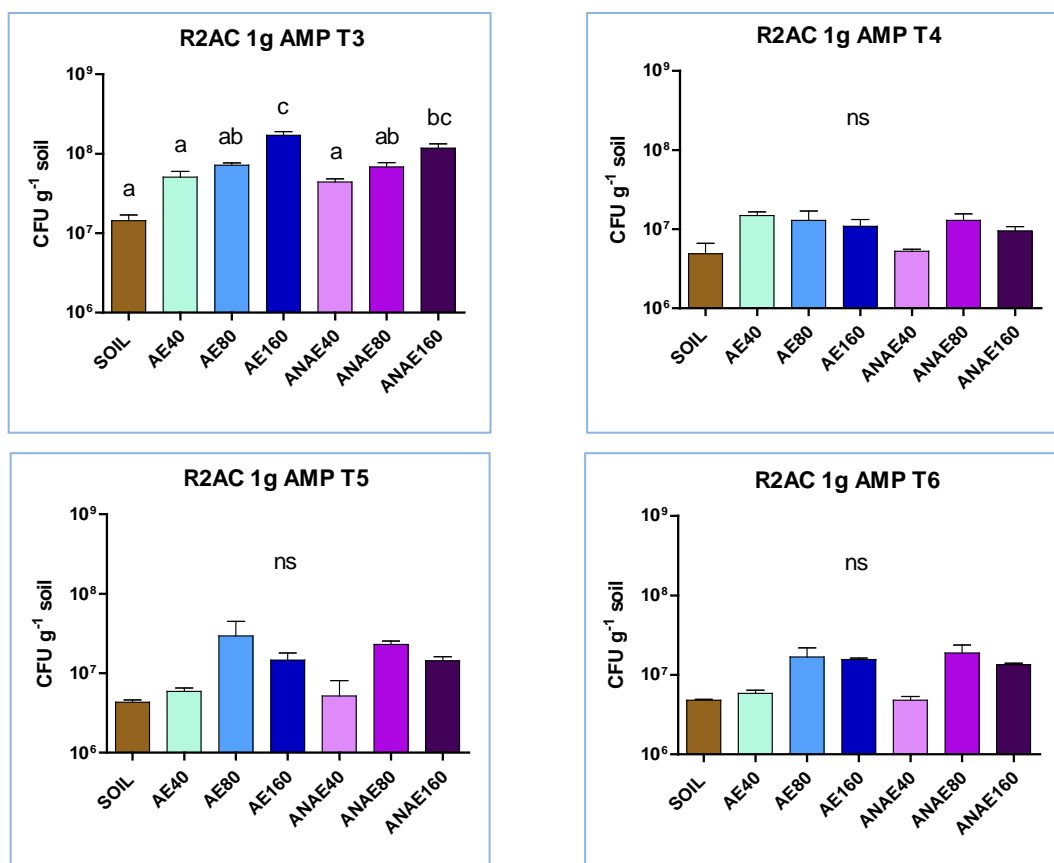
**Tabla 16. Bacterias resistentes a  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ampicilina.** Se indica la media y entre paréntesis la desviación estándar. Datos representados gráficamente en la Figura 22. Los recuentos de bacterias resistentes a  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ampicilina se realizaron a partir de junio de 2008 (T3).



**Figura 20. Bacterias resistentes a 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio R2AC con 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



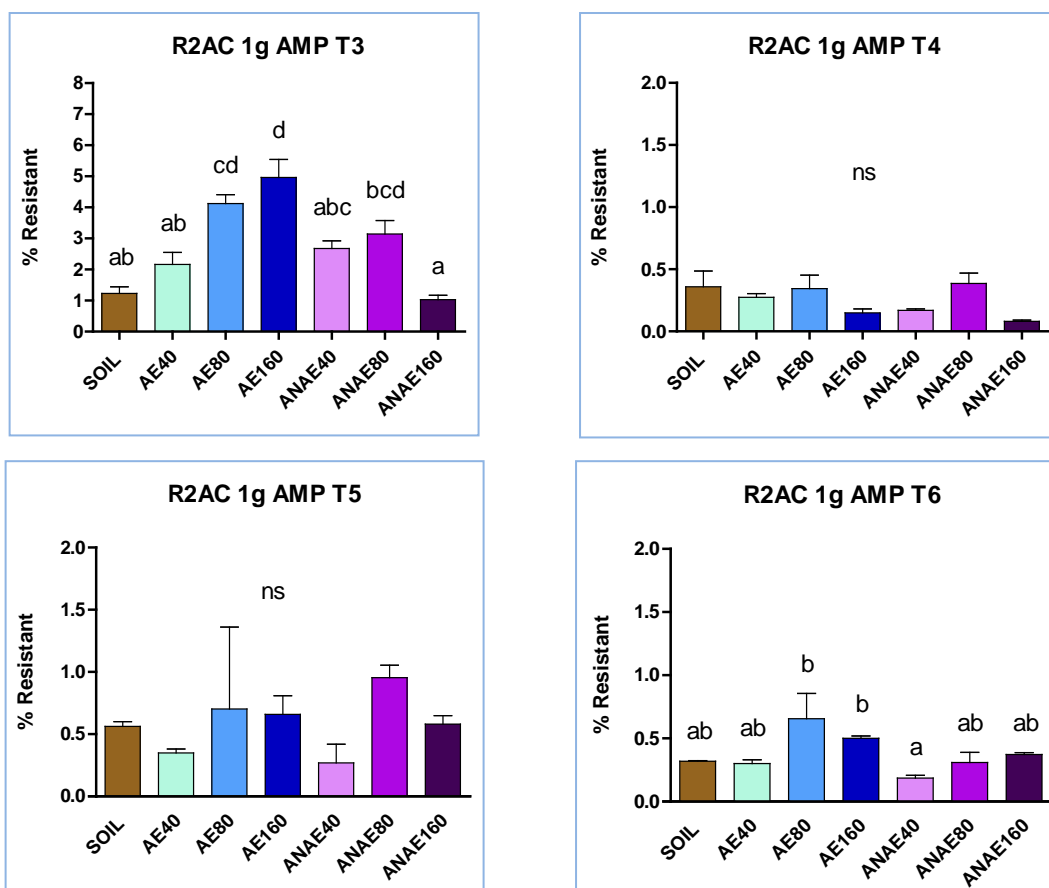
**Figura 21. Bacterias resistentes a 64 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio R2AC con 64 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 22. Bacterias resistentes a 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina.** El recuento se realizó 7 días después de la siembra en medio R2AC con 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina. Se representa la media junto con su error estándar (SEM) en escala logarítmica. La nomenclatura se describe en la Figura 9.

Sin embargo, la presencia de un mayor número de bacterias resistentes podría ser atribuida simplemente a un incremento general del número de bacterias en el suelo. Entonces, ¿cuál fue la proporción *real* de bacterias resistentes en las muestras analizadas? Para ello, hemos calculado el porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina en las parcelas respecto del número total de bacterias encontradas en R2AC (Figura 23). Hemos comprobado que en las parcelas tratadas con **lodo aerobio** existe un mayor porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina, principalmente a 32 µg mL<sup>-1</sup> que se mantuvo incluso hasta el último análisis (2 años después de la aplicación de lodos), detectándose valores superiores en las otras parcelas solamente de forma puntual (ANAE40 - T4; ANAE160 - T5) (Figura 23). Sin embargo, en algunos análisis, no detectamos diferencias significativas en los porcentajes de bacterias resistentes a 64 µg mL<sup>-1</sup> (T5 y T6) y 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina (T4, T5 y T6) (Figura 23).

**Figura 23. Porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina ( $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).** El porcentaje se calculó respecto a la media del número total de bacterias en R2AC en cada una de las muestras correspondientes. Se utilizaron cuadros de color gris para resaltar los siguientes muestreos: T2, T3, T4, T5 y T6. Se representa la media junto con su error estándar (SEM). La nomenclatura se describe en la Figura 9.



**Figura 24. Porcentaje de bacterias resistentes a 1 g L-1 de ampicilina.** El porcentaje se calculó respecto a la media del número total de bacterias en R2AC en cada una de las muestras correspondientes en los muestreos T3 a T6. Se representa la media junto con su error estándar (SEM). La nomenclatura se describe en la Figura 9.

#### 2.5.4 CORRELACIONES ENTRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS, ACTIVIDADES MICROBIANAS Y PARÁMETROS AMBIENTALES.

Con el fin de determinar la relación de la biomasa, la respiración y la humedad con los tipos de microorganismos analizados, hemos calculado el coeficiente de correlación *rho* de *Spearman* utilizando todos los datos de las muestras (Tabla 17). Hemos calculado las mismas relaciones sin incluir los datos de AE160 y ANAE160 (Tabla 18) con el objetivo de observar si existen cambios en esas relaciones y cómo se correlacionaban esas variables, puesto que AE160 y ANAE160 presentan una relación inversa con la biomasa y la respiración.

Al analizar la influencia de la biomasa (Tabla 17), hemos observado una correlación negativa con la humedad y con los tipos de microorganismos en casi todos los análisis, a excepción del muestreo de octubre de 2008 (T4) en el cual hemos detectado una correlación positiva con el número de microorganismos resistentes a  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ampicilina, y con los enterococos. En la mayoría de los muestreos se detectó una correlación positiva entre la biomasa y la respiración basal (Tabla 17). Al analizar las correlaciones excluyendo los datos de AE160 y ANAE160 (Tabla 18), la biomasa se correlacionó positivamente con casi todos los tipos de microorganismos en la mayoría de los muestreos y la correlación positiva con la respiración se ha mantenido.

La respiración de los microorganismos se correlacionó positivamente con la mayoría de las poblaciones microbianas en casi todos los muestreos, a excepción de febrero y junio de 2009 (T5 y T6) en los cuales se convirtió en negativa con casi todas ellas (Tabla 17), de forma similar cuando no se utilizaron los datos de AE160 y ANAE160 con casi todos los tipos de microorganismos (Tabla 18).

Respecto a la humedad, se observó una correlación positiva con gran parte de las poblaciones microbianas analizadas, excepto en algunos análisis en los cuales se detectaron correlaciones negativas con las poblaciones de bacterias resistentes a  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ampicilina (no significativas) y coliformes (significativa) (Tabla 17). Al observar las correlaciones sin los datos de AE160 y ANAE160 (Tabla 18), hemos comprobado que la humedad se correlacionó positivamente con los tipos de microorganismos analizados en casi todos los muestreos, con dos excepciones: octubre de 2008 (T4), en el cual solamente los hongos lo hicieron, y febrero de 2009 (T5), donde fue negativa pero no significativa (Tabla 18).

	T0			T1		
	Biomasa	Respiración	Humedad	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			— 0,512**			— 0,423**
Respiración	0,238*		0,091	0,158		0,041
Oligotróficos	— 0,258*	0,235*	0,349**	— 0,476**	0,127	0,899**
Copiotróficos	— 0,301**	0,280*	0,810**	— 0,524**	0,043	0,906**
Bacterias	— 0,638**	0,166	0,730**	— 0,456**	— 0,001	0,915**
Hongos	— 0,485**	0,148	0,412**	—	—	—
R32	— 0,205	— 0,138	0,438**	— 0,383**	0,066	0,918**
R64	—	—	—	—	—	—
R1	—	—	—	—	—	—
Enterococos	— 0,418**	0,320**	0,431**	— 0,137	0,266*	0,149
Coliformes	— 0,249*	0,250*	0,648**	— 0,019	— 0,446**	0,462**
Clostridios	— 0,124	0,008	0,560**	— 0,319**	— 0,232*	0,664**

	T2			T3		
	Biomasa	Respiración	Humedad	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			— 0,079			— 0,014
Respiración	0,213		0,01	0,505**		— 0,018
Oligotróficos	0,136	0,663**	0,345**	— 0,055	0,12	0,871**
Copiotróficos	— 0,206	0,446**	0,576**	— 0,054	0,116	0,877**
Bacterias	0,039	0,500**	0,541**	— 0,087	0,036	0,840**
Hongos	— 0,410**	0,241*	0,044	— 0,035	— 0,021	0,719**
R32	— 0,186	0,416**	0,648**	— 0,016	0,320**	0,845**
R64	— 0,280*	0,424**	0,547**	0,011	0,283*	0,745**
R1	—	—	—	— 0,076	0,077	0,917**
Enterococos	— 0,382**	0,308*	0,480**	— 0,200	— 0,606**	0,237*
Coliformes	— 0,460**	0,155	0,549**	— 0,322**	— 0,011	0,516**
Clostridios	0,063	— 0,099	0,797**	— 0,109	— 0,210	0,438**

	T4			T5		
	Biomasa	Respiración	Humedad	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			— 0,477**			0,179
Respiración	0,588**		— 0,239*	0,477**		— 0,138
Oligotróficos	— 0,092	0,342**	0,254*	0,266**	0,310**	0,112
Copiotróficos	0,092	— 0,094	0,067	0,085	0,139	0,235*
Bacterias	0,015	0,086	0,419**	0,209	— 0,009	— 0,024
Hongos	— 0,193	0,021	0,866**	— 0,081	— 0,282*	0,417**
R32	0,286*	0,648**	— 0,041	— 0,020	— 0,233*	0,145
R64	0,007	0,304**	0,084	0,159	— 0,283*	0,415**
R1	0,415**	0,273*	— 0,225	0,237*	— 0,218*	0,299**
Enterococos	0,316**	0,414**	0,139	— 0,384**	— 0,390**	— 0,409*
Coliformes	0,144	0,338**	— 0,469**	— 0,063	0,132	0,207
Clostridios	—	—	—	0,178	— 0,319**	0,372**

	T6		
	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			— 0,171
Respiración	0,646**		— 0,117
Oligotróficos	— 0,103	— 0,067	0,599**
Copiotróficos	— 0,088	0,001	0,776**
Bacterias	— 0,017	— 0,268*	0,400**
Hongos	— 0,105	— 0,086	0,602**
R32	0,197	0,233*	0,556**
R64	0,086	0,083	0,614**
R1	— 0,046	— 0,068	0,579**
Enterococos	— 0,252*	— 0,156	0,224
Coliformes	— 0,148	— 0,026	0,709**
Clostridios	0,129	— 0,269*	0,283*

**Tabla 17. Correlaciones entre los tipos de microorganismos y la biomasa, respiración y humedad en todos los muestreos del estudio.** Coeficiente de correlación *Rho de Spearman* calculado utilizando el programa SPSS v19 (IBM). R32, R64 y R1: bacterias resistentes a 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 1  $\text{g L}^{-1}$  de ampicilina, respectivamente.



	T0			T1		
	Biomasa	Respiración	Humedad	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			— 0,427**			0,179
Respiración	0,188		0,411**	0,199		0,176
Oligotróficos	0,449**	0,510**	0,274*	0,062	0,392**	0,825**
Copiotróficos	0,005	0,783**	0,687**	— 0,064	0,241	0,846**
Bacterias	— 0,429**	0,406**	0,984**	0,073	0,113	0,765**
Hongos	— 0,246	0,363**	0,183	—	—	—
R32	— 0,252	— 0,233	0,352*	0,259	0,290*	0,855**
R64	—	—	—	—	—	—
R1	—	—	—	—	—	—
Enterococos	0,274*	0,879**	0,363**	0,203	0,295*	— 0,651**
Coliformes	— 0,279*	0,560**	0,281*	0,296*	— 0,517**	0,201
Clostridios	0,115	0,416**	0,684**	— 0,002	— 0,192	0,417**

	T2			T3		
	Biomasa	Respiración	Humedad	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			0,033			0,757**
Respiración	0,177		0,054	0,575**		0,321*
Oligotróficos	0,382**	0,846**	0,137	0,716**	0,522**	0,671**
Copiotróficos	0,224	0,801**	0,293*	0,694**	0,605**	0,629**
Bacterias	0,308*	0,633**	0,386**	0,551**	0,462**	0,515**
Hongos	— 0,209	0,399**	— 0,180	0,463**	— 0,076	0,759**
R32	0,162	0,683**	0,452**	0,778**	0,758**	0,723**
R64	0,041	0,763**	0,286*	0,721**	0,535**	0,723**
R1	—	—	—	0,664**	0,333*	0,880**
Enterococos	— 0,067	0,573**	0,214	— 0,251	— 0,479**	— 0,036
Coliformes	— 0,367*	0,252	0,396**	— 0,144	0,312*	— 0,281*
Clostridios	0,014	— 0,200	0,811**	0,021	0,042	0,008

	T4			T5		
	Biomasa	Respiración	Humedad	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			— 0,261			0,370**
Respiración	0,570**		0,017	0,458**		— 0,224
Oligotróficos	0,157	0,585**	— 0,204	0,408**	0,333*	— 0,158
Copiotróficos	0,522**	0,304*	— 0,785**	0,399**	0,413**	— 0,137
Bacterias	0,683**	0,669*	— 0,489**	0,422**	0,188	— 0,028
Hongos	0,211	0,344*	0,734**	0,082	— 0,264	0,197
R32	0,392**	0,709**	— 0,279	0,313*	0,126	0,027
R64	0,114	0,412**	— 0,374**	0,573**	0,174	0,509**
R1	0,581**	0,367**	— 0,478**	0,365**	— 0,093	0,296*
Enterococos	0,819**	0,713**	— 0,457**	— 0,358**	— 0,094	— 0,412**
Coliformes	0,169	0,432**	— 0,676**	— 0,029	0,125	— 0,236
Clostridios	—	—	—	0,609**	0,077	0,518**

	T6		
	Biomasa	Respiración	Humedad
Biomasa			0,222
Respiración	0,662**		0,163
Oligotróficos	— 0,016	— 0,137	0,407**
Copiotróficos	0,188	0,078	0,582**
Bacterias	0,078	— 0,093	0,424**
Hongos	— 0,022	— 0,174	0,423**
R32	0,380**	0,228	0,475**
R64	0,199	0,023	0,618**
R1	0,215	0,088	0,415**
Enterococos	— 0,272*	— 0,390**	— 0,213
Coliformes	0,125	0,088	0,660**
Clostridios	0,100	— 0,077	0,533**

**Tabla 18. Correlaciones entre los tipos de microorganismos y la biomasa, respiración y humedad en todos los muestreos del estudio, sin los datos de AE160 y ANAE160.** Coeficiente de correlación *Rho de Spearman* calculado utilizando el programa SPSS v19 (IBM). R32, R64 y R1: bacterias resistentes a 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 1  $\text{g L}^{-1}$  de ampicilina, respectivamente.

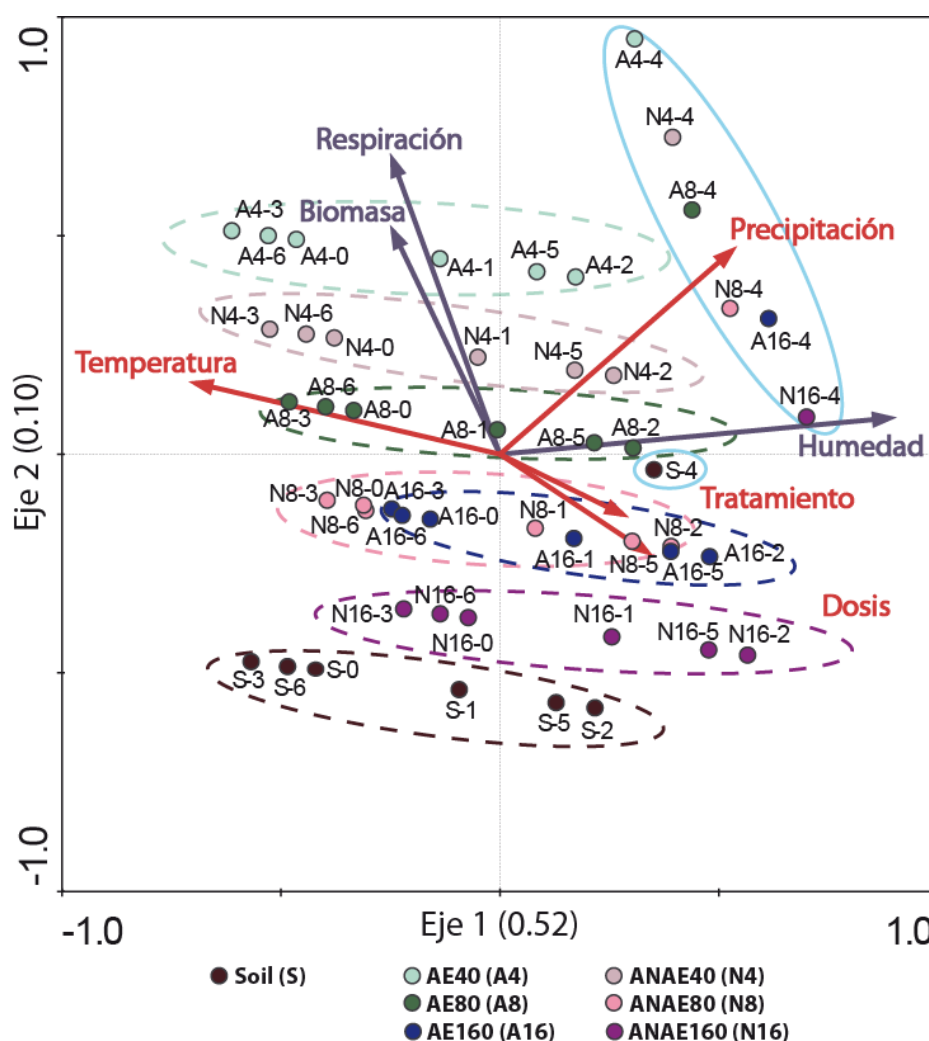
### 2.5.5 INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES EN LAS PROPIEDADES MICROBIANAS ANALIZADAS.

Con el objetivo de buscar pautas y tendencias generales en la dinámica de los tipos de microorganismos analizados, así como discernir qué parámetros ambientales podrían influir en el crecimiento de dichos microorganismos, se optó por realizar análisis de ordenación. Para ello, realizamos análisis multivariantes directos de gradiente y, en concreto, análisis de redundancia (RDA) en los que hemos utilizado como parámetros ambientales la *humedad*, la temperatura media de los 3 últimos días (*temperatura*), la precipitación acumulada en los tres días previos al muestreo (*precipitación*), el *tratamiento* (*Soil*, AE40, AE80, AE160, ANAE40, ANAE80 y ANAE160), *dosis* (0, 40, 80 o 160 t ha<sup>-1</sup>), y el tipo de *lodo* aplicado (ninguno, aerobio, anaerobio), utilizando como variables explicativas la biomasa, la humedad, la respiración y los tipos de microorganismos analizados en el estudio (oligotróficos, copiotróficos, bacterias patógenas de origen fecal y bacterias resistentes a ampicilina). Este análisis se llevó a cabo con el programa *Canoco* utilizado habitualmente en análisis de ecología de comunidades bióticas.

Para la biomasa, respiración y humedad (variables explicativas) hemos utilizado como variables ambientales la *precipitación*, la *temperatura*, la *dosis* y el *tratamiento* de lodo aplicado (Figura 25). De entre los parámetros ambientales, la *precipitación* y la *temperatura* permiten explicar la mayor parte de la variación observada, seguidos del *tratamiento* y de la *dosis* de lodo aplicada (Figura 25). El eje horizontal explica un 52 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la *precipitación*, acompañada del *tratamiento* y de la *dosis* de lodo aplicada. El extremo negativo de ese eje se asocia a la *temperatura* (Figura 25). El eje vertical solo explica un 10 % de esa varianza y está definido en su extremo positivo por la *temperatura* y la *precipitación*, mientras que en el extremo negativo por la *dosis* y el *tratamiento* (Figura 25).

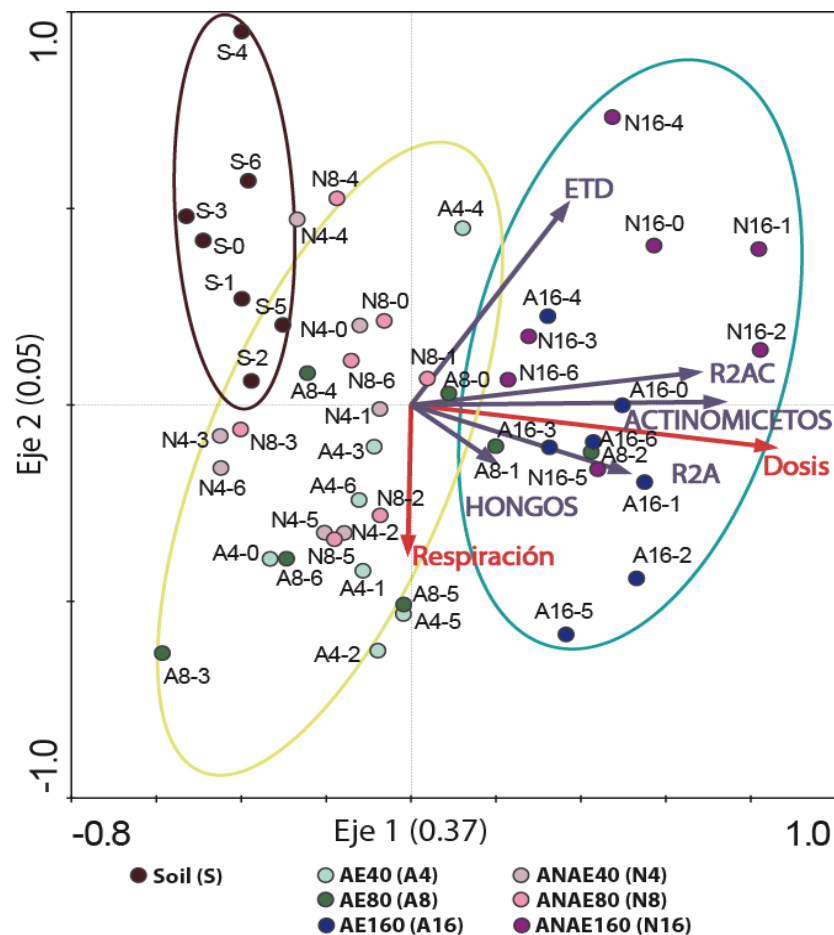
La distribución de las muestras en el gráfico obedece a la relación de la biomasa y la respiración con la dosis y tratamiento aplicado. Así, las parcelas tratadas con menores dosis presentan mayores valores de biomasa y respiración, como hemos observado previamente (Figura 9 y Figura 10), y se disponen en la región positiva del eje vertical. Por el contrario, las parcelas con menores valores de respiración y biomasa (elipses morada y rosa, discontinua) se asocian por su relación con la *dosis* y el *tratamiento*. (Figura 25). La distribución de las muestras del suelo control (*Soil*, elipse marrón discontinua), es muy próxima a éstas últimas, resultado de sus valores de respiración y biomasa similares a los de las muestras tratadas con mayor dosis (Figura 9 y Figura 10). La influencia de la *temperatura* en la ordenación se puede observar en la ordenación de las muestras recogidas en verano (T0, T3 y T6) que se disponen en el extremo negativo del eje horizontal, mientras que los muestreos del resto de las estaciones se sitúan en el extremo opuesto. Las muestras recogidas en otoño de 2008 (T4) se distribuyen de manera independiente al resto de las muestras (elipse continua azul), distribución que puede deberse a la mayor *precipitación* ocurrida en ese periodo de muestreo y por lo tanto, una mayor *humedad* detectada (Figura 25), aunque el resto de los muestreos con mayor precipitación (T1, T2 y T5) también se ordenan en la

región positiva del eje horizontal, siguiendo el vector de la precipitación y, por tanto, el de la humedad .



**Figura 25. Diagrama de ordenación mediante análisis de redundancia (RDA) de las muestras en función de su biomasa, respiración y humedad.** Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. Soil – S; AE40 – A4; AE80 – A8; AE160 – A16; ANAE40 – N4; ANAE80 – N8; ANAE160 – N16. Los valores utilizados corresponden a los muestreos del estudio (0 - T0, 1 - T1, 2 - T2, 3 - T3, 4 - T4, 5 - T5, 6 - T6). Fue llevado a cabo con el programa *Canoco para Windows versión 4.5* utilizando un análisis de redundancia (RDA). La significación estadística de los ejes canónicos se evaluó por medio del test de permutación de Montecarlo, con 999 permutaciones bajo el modelo reducido, seleccionándose aquellas propiedades estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) que describen la distribución. El primer eje explicó un 52 % de la varianza y el segundo, un 10 %. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la *precipitación* (0,001/19,53), la *temperatura* (0,001/15,94), el *tratamiento* (0,005/8,33) y la *dosis de lodo* (0,009/6,22).

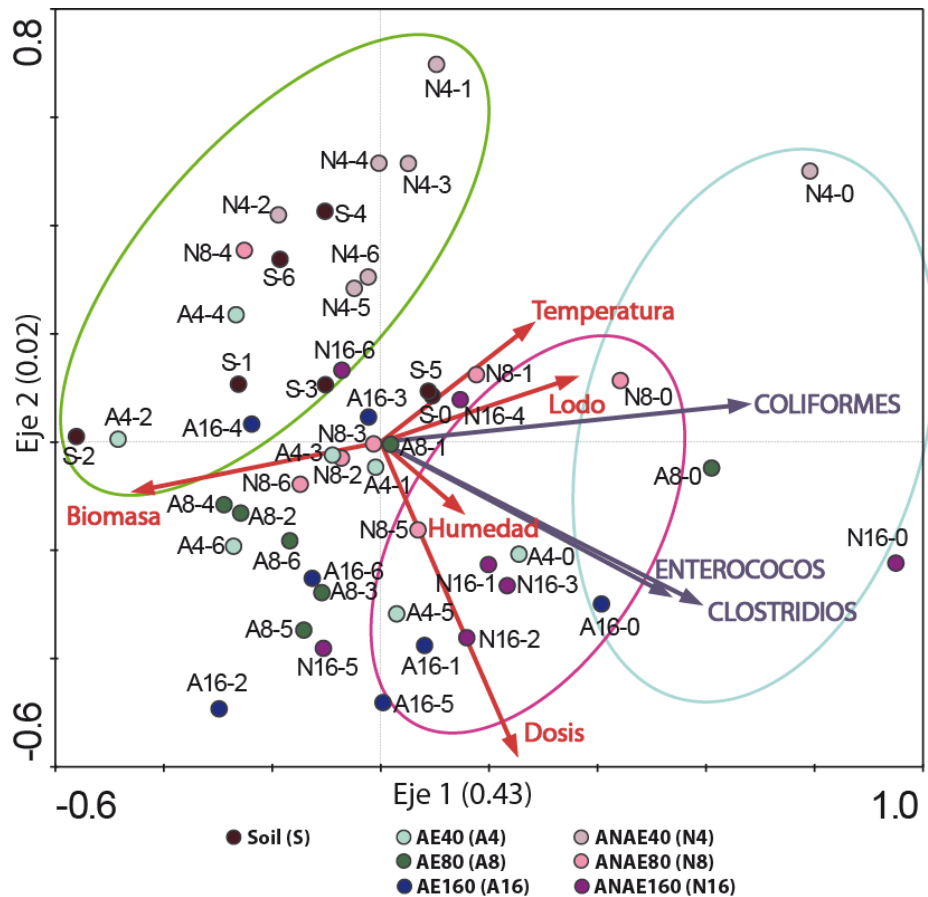
Cuando analizamos la influencia de los mismos parámetros ambientales a los microorganismos copiotróficos y oligotróficos, se puede comprobar que la dosis de lodo aplicada, seguida de la respiración (medida con el sistema Microresp) son las variables más influyentes y justifican la distribución de las muestras (Figura 26). El eje horizontal explica un 37 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la dosis de lodo aplicada (Figura 26). Efectivamente, la influencia de la dosis en el incremento del número de microorganismos oligotróficos y copiotróficos indicado previamente (Figura 11, Figura 12, Figura 13, Figura 14 y Figura 15), explica la ordenación de las muestras con mayor dosis (elipse azul), al contrario que las muestras tratadas con menor dosis (elipse ocre) y el suelo control (elipse marrón) (Figura 26). El eje vertical, por el contrario, solo explica un 5 % de esa varianza y su extremo negativo es definido por la respiración (Figura 26) lo que, sin embargo, permite agrupar las muestras con mayores valores de respiración que coinciden con las muestras tratadas con dosis bajas de lodo (Figura 10).



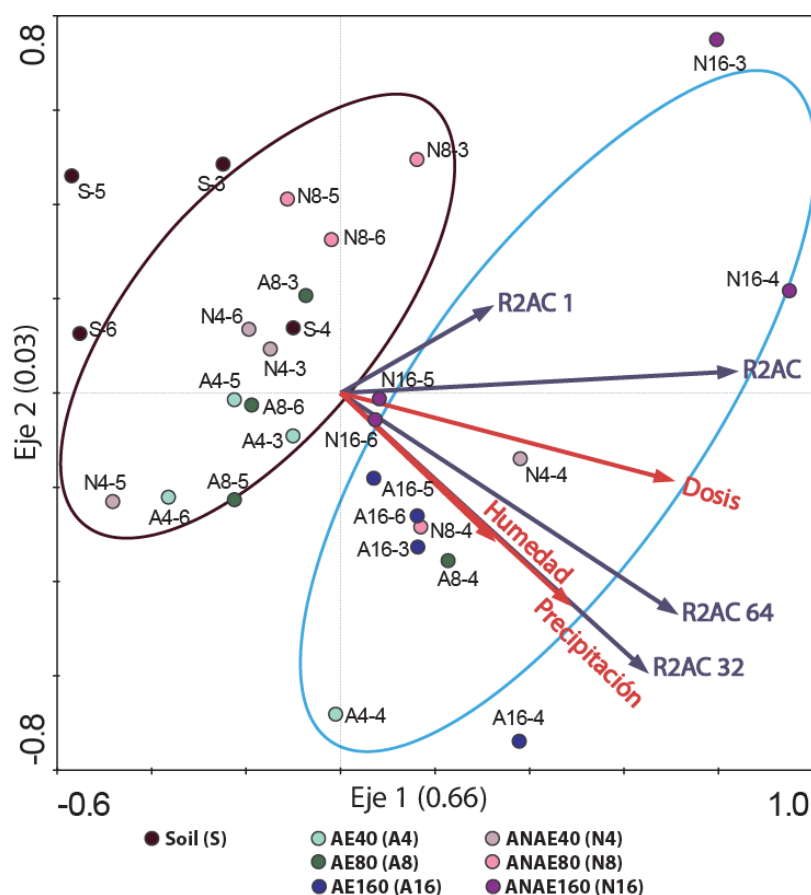
**Figura 26. Diagrama de ordenación mediante análisis de redundancia (RDA) de las muestras en función de las poblaciones de oligotróficos y copiotróficos analizados.** Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. Los datos de *respiración* fueron medidos con el sistema *Microresp*. El primer eje explicó un 37 % de la varianza y el segundo, un 5 %. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la *dosis* de lodo aplicada (0,001/16,80) y la *respiración* (0,021/3,88).

En el caso de las bacterias patógenas de origen fecal (coliformes, enterococos y clostridios), los parámetros ambientales que más influyen son la humedad, la biomasa, la temperatura, el tipo (lodo) y la dosis de lodo aplicada, en este orden (Figura 27). El eje horizontal expresa un 43 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la temperatura, mientras que el extremo negativo de ese eje se define por la biomasa (Figura 27). El eje vertical explica solamente un 2 % de esa varianza y su extremo negativo se define por la dosis de lodo y la humedad (Figura 27). Efectivamente, las muestras con menor cantidad de patógenos se distribuyen conjuntamente (elipse verde) y separadas de aquellas con mayores valores que corresponden las iniciales (T0, elipse azul) y a las de mayor dosis (elipse rosa) (Figura 27), sugiriendo nuevamente que la dosis y la humedad son los factores primordiales en el crecimiento de estos microorganismos, como hemos sugerido previamente (Figura 17, Figura 18, Figura 19, Tabla 17 y Tabla 18) y, por tanto, en la ordenación. El efecto de la temperatura no parece ser tan claro, pero la biomasa justifica la ordenación de las muestras de menor dosis y el suelo control en el lado izquierdo de la gráfica (Figura 27), siguiendo una correlación inversa con los valores de microorganismos patógenos ya descrita previamente (Figura 9, Tabla 17 y Tabla 18).

La influencia de los distintos parámetros ambientales en la dinámica de las poblaciones de microorganismos resistentes a 32 y 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y 1  $\text{g L}^{-1}$  de ampicilina se comprueba en el diagrama de ordenación (RDA) realizado para los muestreos de junio de 2008 a junio de 2009 (T3-T6) (Figura 28). De entre esas variables ambientales utilizadas, la dosis de lodo aplicada, la precipitación y la humedad explican la ordenación (Figura 28). El eje horizontal expresa un 66 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la dosis de lodo, la humedad y la precipitación. El eje vertical explica solamente un 3 % de esa varianza y está definido en su extremo negativo por la precipitación y la humedad (Figura 28). En el gráfico parecen existir dos grupos separados, uno de los cuales presentan menores valores de bacterias resistentes a ampicilina (elipse marrón), mientras que el englobado por la elipse azul presenta valores superiores. Esta distribución se justifica por la influencia de la dosis, la humedad y la precipitación, observándose incluso que las muestras del análisis de octubre de 2008 (T4), se encuentran más distancias si cabe, probablemente influenciada, a juzgar por el gráfico, por su mayor índice de humedad, como hemos indicado previamente (Figura 14, Figura 20, Figura 21, Figura 22, Tabla 17 y Tabla 18).



**Figura 27. Diagrama de ordenación RDA de las muestras en función de las poblaciones de microorganismos patógenos.** Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. El primer eje explicó un 43 % de la varianza y el segundo, un 2 %. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la *humedad* (0,001/11,30), la *biomasa* (0,029/4,46), la *temperatura* (0,025/3,93), el tipo de lodo (*lodo*) (0,033/3,80) y la *dosis* de lodo aplicada (0,058/3,28).



**Figura 28. Diagrama de ordenación RDA de las muestras en función de las poblaciones de microorganismos resistentes a ampicilina (muestreos: T3, T4, T5 y T6).** Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las flechas azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. R2AC – R2A con cicloheximida, R2AC 32 – R2A con cicloheximida y 32  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ampicilina, R2AC 64 – R2A con cicloheximida y 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina y R2AC 1 – R2A con cicloheximida y 1  $\text{g L}^{-1}$  de ampicilina. El primer eje explicó un 66 % de la varianza y el segundo, un 3 %. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la *dosis* de lodo (0,001/12,35), la *precipitación* (0,008/7,65) y la *humedad* (0,049/4,38).

De nuestro trabajo conjunto con el grupo de Edafología del profesor Casermeiro, existe una serie de propiedades correspondientes a los muestreos de junio de cada año (T0, T3 y T6), que caracterizan el suelo en cada análisis. Éstas son la humedad, la respiración ( $\text{CO}_2$  - medida con un analizador de gases infrarrojo portátil *Li-COR 8100®*), el contenido en carbono orgánico (en % y en  $\text{g Kg}^{-1}$ ), carbonatos (%), bicarbonatos ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ), carbono soluble (*C sol.* -  $\text{mg/Kg}$ ), nitrógeno soluble (*N Sol.* -  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), *Na*, *K*, *Ca*, *Mg*, *pH*, *conductividad* (en  $\text{mS cm}^{-1}$ ), carbono fácilmente degradable o fracción lábil 1 y 2 - (*Lp1*, la más sencilla, y *Lp2*), carbono recalcitrante (*R*), capacidad de intercambio catiónico (*CIC*) y la relación entre el carbono y el nitrógeno soluble ( $\text{C}_{\text{sol}}:\text{N}_{\text{sol}}$ ). Estas propiedades han sido incluidas en los estudios de ordenación de nuestras muestras con el fin de comprobar cuáles son las que más influyen. A priori, algunas variables ambientales influirían menos en este nuevo análisis puesto que los muestreos pertenecen a la misma estación (verano – T0, T3 y T6).

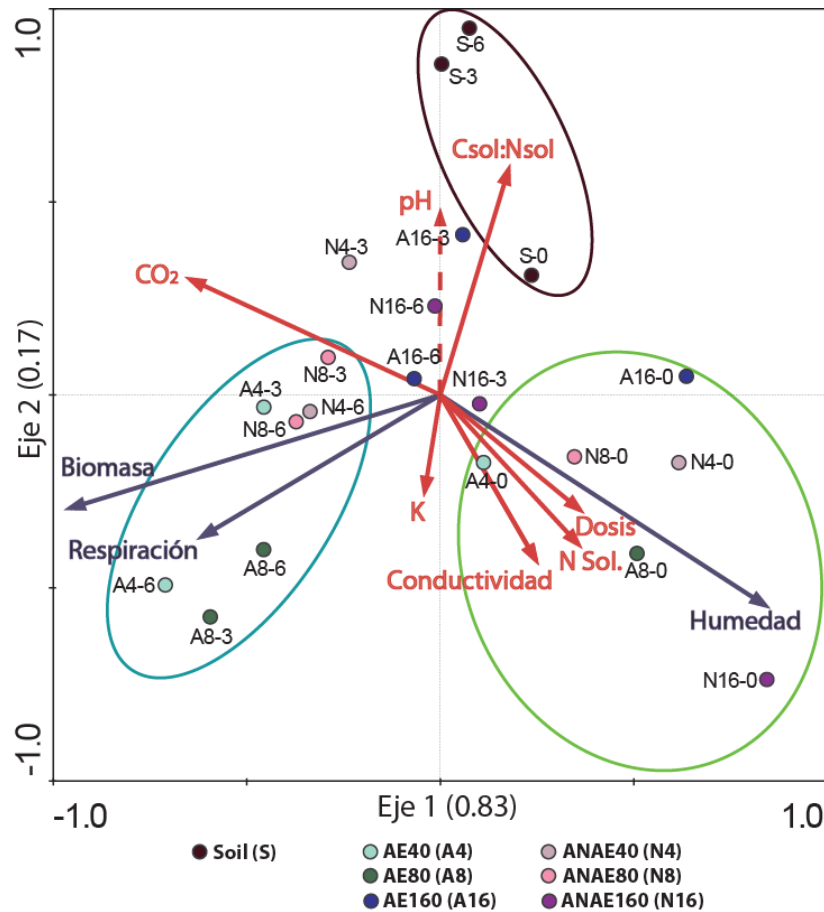
Los parámetros ambientales más influyentes en la biomasa, respiración y humedad resultaron ser el nitrógeno soluble (*N Sol.*), la relación  $C_{sol}:N_{sol}$ , la *conductividad*, la *dosis* de lodo utilizada, el potasio (*K*) y el *pH*, aunque es menos influyente (Figura 29). El eje horizontal expresa un 83 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la *dosis* de lodo, el *nitrógeno soluble*, la *conductividad* y la *humedad*, mientras que el extremo negativo se define por la respiración medida con el sistema LiCOR ( $CO_2$ ) (Figura 29). El eje vertical explica solamente un 17% de esa varianza y su extremo positivo se explica por el *pH* y la relación  $C_{sol}:N_{sol}$ , mientras que el extremo negativo se define por el *potasio* (Figura 29).

La influencia de la dosis, el nitrógeno soluble y la conductividad se manifiesta en la agrupación de las muestras de suelo tratadas con lodos del primer análisis (T0, elipse verde), evolucionando a partir de ese momento. La relación  $C_{sol}:N_{sol}$ , el *pH* del suelo y el potasio se relacionan con el suelo control (*Soil*, elipse marrón) y algunas muestras, sobre todo las tratadas con mayores dosis de lodo (Figura 29). La biomasa y la respiración (ambas, *respiración* y  $CO_2$ ) lo hacen con las muestras tratadas con menores dosis de lodos (elipse azul), como hemos sugerido previamente (Figura 9 y Figura 10).

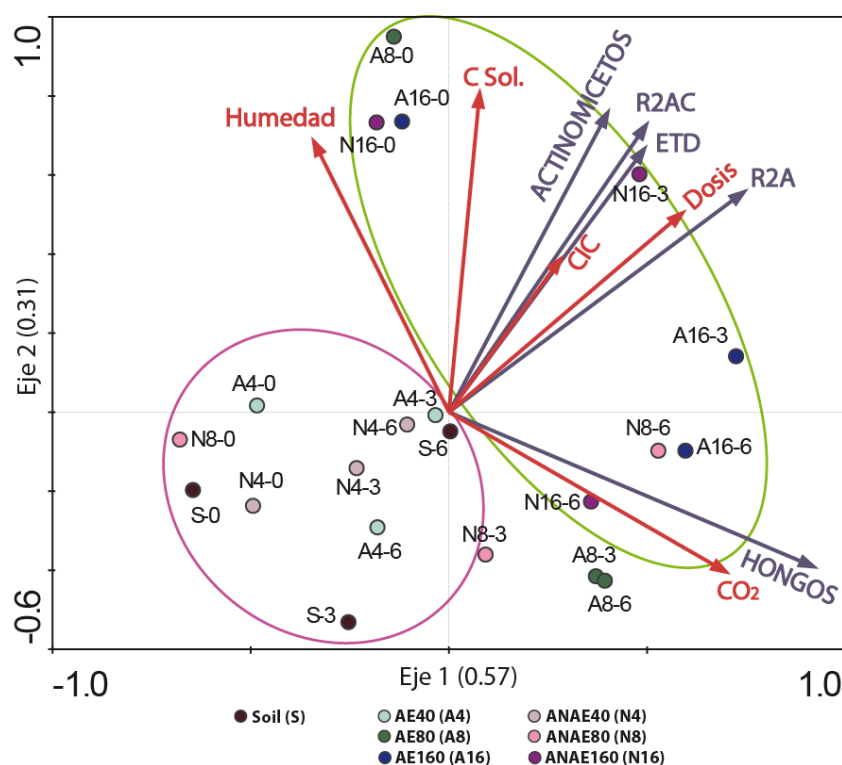
De la misma manera que para los valores de biomasa y la respiración, los valores de microorganismos copiotróficos y oligotróficos se encuentran influidos por la *dosis* de lodo aplicada y la respiración medida con el *Li-COR 8100®* ( $CO_2$ ), la concentración de carbono soluble (*C Sol.*), la *humedad*, la capacidad de intercambio catiónico del suelo (*CIC*), por este orden (Figura 30). El eje horizontal expresa un 57 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la *dosis* de lodo, la *capacidad de intercambio catiónico* y la respiración ( $CO_2$ ). El eje vertical explica un 31 % de esa varianza y su extremo positivo se define por el *carbono soluble* y la *humedad*, mientras que el extremo negativo se define por la tasa de *respiración* (Figura 30).

Las parcelas con mayor cantidad de lodos presentan valores superiores de este tipo de microorganismos, de ahí que la dosis, la capacidad de intercambio catiónico, el carbono soluble y la humedad influyan en la ordenación, agrupando esas muestras (elipse verde), separadamente de las muestras de menor dosis y el suelo control (elipse morada) (Figura 30).





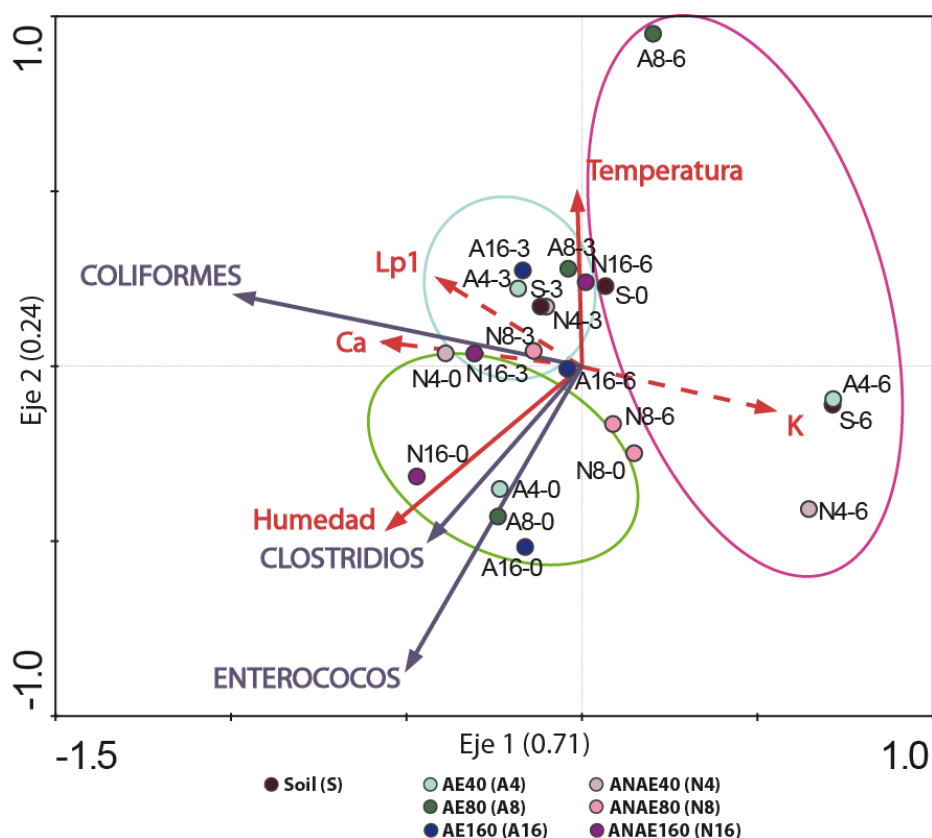
**Figura 29. Diagrama de ordenación RDA de las muestras en función de la biomasa, la respiración y la humedad utilizando variables ambientales adicionales (Edafología).** Análisis realizado para los muestreos de junio de 2007, 2008 y 2009 (T0, T3 y T6). Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las flechas azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. El primer eje explicó un 83 % de la varianza y el segundo, un 17 %. Las variables fueron normalizadas mediante transformación logarítmica. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron el  $CO_2$  (0,001/10,66), nitrógeno soluble - *N sol.* (0,016/7,86), la relación  $C_{sol}:N_{sol}$  (0,020/5,68), la conductividad (0,024/6,60), la dosis de lodo aplicada (0,027/4,32), el potasio - *K* (0,046/4,06) y el *pH* (0,056/4,31) que influye menos y se representa con una línea discontinua.



**Figura 30. Diagrama de ordenación RDA de las muestras en función de las poblaciones de oligotróficos y copiotróficos analizadas utilizando variables ambientales adicionales (Edafología). Análisis realizado para los muestreos de junio de 2007, 2008 y 2009 (T0, T3 y T6).** Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las flechas azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. El primer eje explicó un 57 % de la varianza y el segundo, un 31 %. Las variables fueron normalizadas mediante transformación logarítmica. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la *dosis* de lodo (0,001/11,37), el  $CO_2$  (0,001/9,56), el carbono soluble (*C sol.*) (0,013/3,92), la *humedad* (0,045/12,64) y la capacidad de intercambio catiónico (*CIC*) (0,060/2,63).

En cuanto a la influencia de esas variables en las bacterias patógenas analizadas, la *temperatura* y la *humedad* son los parámetros más influyentes (Figura 31), como hemos sugerido previamente (Figura 27). El calcio (Ca), el potasio (K) y una de las fracciones lábiles del carbono (Lp1, la más sencilla) están representados por líneas discontinuas y son menos influyentes (Figura 31). El eje horizontal expresa un 71 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la cantidad de potasio y su extremo negativo, por la humedad, cantidad de calcio y la fracción lábil 1 – Lp1. El eje vertical explica un 24 % de esa varianza y su extremo positivo se define por la temperatura (Figura 31). El incremento de la humedad influye en la asociación de las muestras con mayor cantidad de clostridios y enterococos, sobre todo, y las muestras tratadas con lodos sobre todo las de los muestreos de junio de 2007 y 2008 - T0 y T3 (elipse verde) (Figura 31). En cambio, la cantidad de potasio influiría en el número de bacterias patógenas de manera inversa, puesto que permite la agrupación de las muestras con menor presencia (S0 y las muestras de menor dosis del último muestreo –T6) – elipse rosa (Figura 31). La temperatura, el calcio y la fracción lábil 1 (Lp1) se

asocian principalmente con un mayor número de coliformes y con las muestras tratadas con lodo (elipse azul) (Figura 30 y Figura 31).

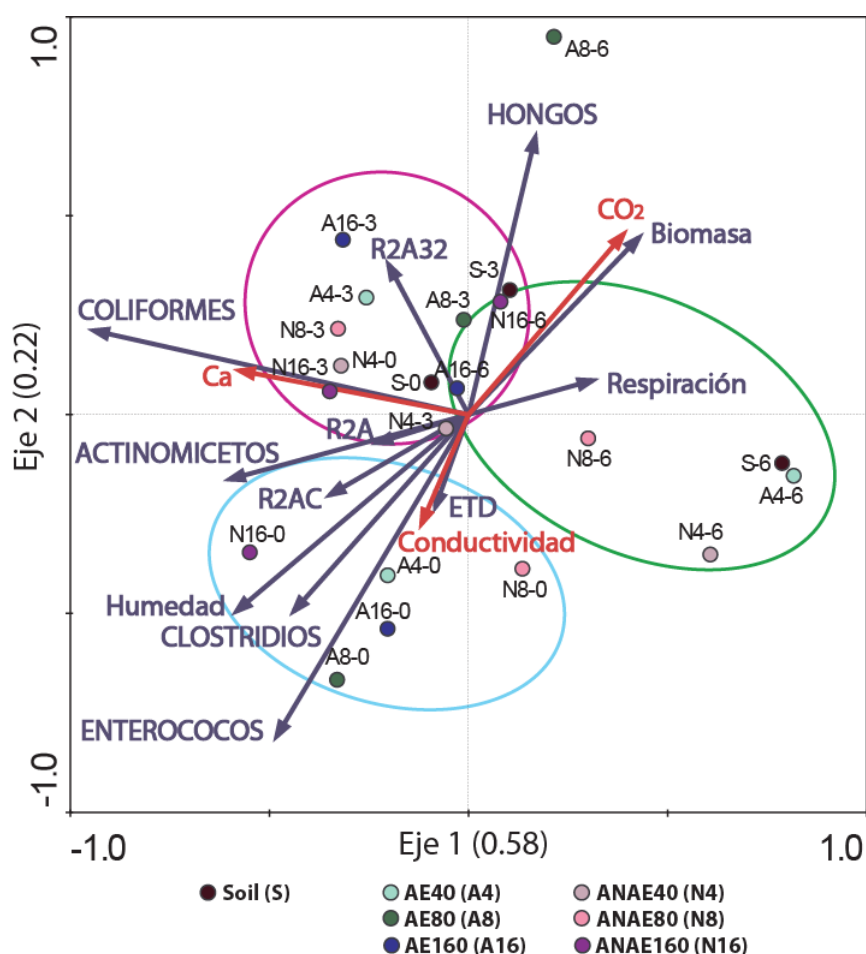


**Figura 31. Diagrama de ordenación RDA de las muestras en función de las poblaciones de las poblaciones de microorganismos patógenos utilizando variables ambientales adicionales (Edafología).** Análisis realizado para los muestreos de junio de 2007, 2008 y 2009 (T0, T3 y T6). Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las flechas azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. El primer eje explicó un 71 % de la varianza y el segundo, un 24 %. Las variables fueron normalizadas mediante transformación logarítmica. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la temperatura (0,001/8,63), la humedad (0,005/7,00), el calcio - Ca (0,079/3,96), potasio - K (0,081/2,52) y el Lp1 (0,090/2,58), aunque estas tres últimas variables son menos influyentes y se representan con líneas discontinuas.

Cuando analizamos la influencia de esas variables ambientales en todas las variables explicativas estudiadas de manera conjunta (tipos de microorganismos, biomasa, respiración y humedad), los parámetros que más influyen en la ordenación son el calcio (Ca), la respiración medida con el aparato *Li-COR 8100®* ( $CO_2$ ) y la conductividad (Figura 32). El eje horizontal expresa un 58 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por la respiración ( $CO_2$ ), mientras que el extremo negativo se define por la cantidad de calcio (Figura 32). El eje vertical explica un 22 %

de esa varianza y su extremo positivo se define por la respiración ( $CO_2$ ), y el extremo negativo se expresa por la *conductividad* (Figura 32).

Se repite la relación entre la *humedad* y la *conductividad* con el incremento de los valores de microorganismos analizados y con las muestras del primer análisis (T0, elipse azul). La presencia de calcio parece asociarse con todos los tipos de microorganismos excepto los hongos y la biomasa y la respiración. Parece haber una evolución en sentido horario de las muestras en T0, T3 y T6 (elipses azul, rosa y verde, respectivamente), asociada con una disminución paulatina del número de microorganismos, aspecto que ya se aprecia en la Figura 31, y un incremento de la respiración (Figura 32).



**Figura 32.** Diagrama de ordenación RDA de las muestras en función de la biomasa, la respiración, la humedad y los tipos de microorganismos analizados utilizando variables ambientales adicionales (Edafología). Análisis realizado para los muestreos de junio de 2007, 2008 y 2009 (T0, T3 y T6). Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las flechas azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. El primer eje explicó un 58 % de la varianza y el segundo, un 22 %. Las variables fueron normalizadas mediante transformación logarítmica. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron el calcio (*Ca*) (0,014/4,72), el  $CO_2$  (0,027/3,62) y la *conductividad* (0,047/3,41).

Puesto que dependiendo del tipo de propiedad analizada unas veces parecen influir aspectos relativos al tratamiento mientras que otras son las características del suelo, procedimos a llevar a cabo un análisis de ANOVA (modelo lineal general univariante) con el fin de determinar cuál de esas propiedades influye más en cada uno de las variables microbianas analizadas (Tabla 19).

	Biomasa		Respiración		Oligotróficos		Copiotróficos	
	F ratio	P value	F ratio	P value	F ratio	P value	F ratio	P value
Características del suelo	<b>136,167</b>	<0,001	25,109	<0,001	95,156	<0,001	349,807	<0,001
Tratamiento	111,319	<0,001	<b>271,452</b>	<0,001	<b>109,352</b>	<0,001	<b>610,268</b>	<0,001
Trat. x Caract. suelo	8,96	<0,001	7,834	<0,001	29,948	<0,001	84,896	<0,001
R <sup>2</sup>	0,789		0,815		0,825		0,95	

	Bacterias		R2AC 32		R2A64 (T2-T6)		R2A1g (T3-T6)	
	F ratio	P value	F ratio	P value	F ratio	P value	F ratio	P value
Características del suelo	112,318	<0,001	423,088	<0,001	<b>222,461</b>	<0,001	<b>552,198</b>	<0,001
Tratamiento	<b>195,581</b>	<0,001	<b>432,352</b>	<0,001	184,618	<0,001	71,856	<0,001
Trat. x Caract. suelo	26,415	<0,001	46,626	<0,001	23,982	<0,001	48,302	<0,001
R <sup>2</sup>	0,851		0,935		0,883		0,921	

	Hongos (- T1)		Enterococos		Coliformes		Clostridios (- T4)	
	F ratio	P value	F ratio	P value	F ratio	P value	F ratio	P value
Características del suelo	<b>319,409</b>	<0,001	<b>7320,72</b>	<0,001	<b>5164,33</b>	<0,001	<b>92,019</b>	<0,001
Tratamiento	135,867	<0,001	2235,16	<0,001	2636,73	<0,001	34,912	<0,001
Trat. x Caract. Suelo	49,565	<0,001	1128,72	<0,001	2223,39	<0,001	23,343	<0,001
R <sup>2</sup>	0,908		0,995		0,996		0,777	

**Tabla 19. Análisis de la influencia de las características del suelo y del tratamiento aplicado en las poblaciones y actividades microbianas de los suelos analizados.** Llevado a cabo con el programa SPSS v19 mediante un análisis ANOVA univariante entre las distintas poblaciones microbianas, la biomasa y la respiración entre las características del suelo, el tratamiento aplicado y la combinación de ambas variables (Trat. x Caract. suelo). Las características del suelo se refieren a los parámetros medidos en cada muestreo. Los valores más significativos se reflejan en un mayor F ratio que indica el efecto más marcado en una variable. Estos datos están destacados en verde y negrita.

Las características del suelo y el tratamiento influyen de manera distinta en las poblaciones, biomasa y respiración microbianas como se puede comprobar a través de los valores de F ratio en la Tabla 19. Así, las características del suelo influyeron significativamente en la biomasa microbiana y en la abundancia de diversos grupos de microorganismos (bacterias resistentes a 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina, hongos, enterococos, coliformes y clostridios), mientras que el tratamiento influyó más en el caso de la

respiración y los recuentos de microorganismos oligotróficos y copiotróficos. En cuanto a la población de microorganismos resistentes a 32 y 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, influyeron de forma muy similar ambos aspectos (Tabla 19).

Además, ambos aspectos conjuntamente (el tratamiento y las características del suelo) influyeron mucho más significativamente en los recuentos de las poblaciones microbianas que en las mediciones de biomasa y respiración microbiana.

## 2.6 DISCUSIÓN

---

### 2.6.1 ALTERACIONES GENERALES DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL SUELO TRAS LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA.

#### 2.6.1.1 EFECTO DE LOS LODOS EN LA BIOMASA Y EN LA RESPIRACIÓN MICROBIANA.

La utilización de lodos de depuradora como fertilizantes orgánicos en suelos agrícolas es una forma clásica y económica de reciclar estos residuos (Rauch y Becker, 2000; Diacono y Montemurro, 2010). Además, es una forma de incrementar la biomasa microbiana y la actividad enzimática, mejorando las propiedades del suelo como, por ejemplo, la capacidad de almacenamiento de agua, la porosidad, la estabilidad de ese ecosistema (Tejada *et al.*, 2009) y la actividad microbiana en suelos degradados (Ros *et al.*, 2003; Bastida *et al.*, 2007a). Por tanto, las mediciones de biomasa microbiana y de actividad enzimática podrían servir para evaluar la calidad y las propiedades de los suelos tratados (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Kuntz *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Singh y Agrawal, 2008; Bastida *et al.*, 2009).

En nuestro trabajo hemos podido comprobar que la biomasa y la respiración del suelo se incrementaron al añadir lodos de depuradora respecto a las parcelas sin tratar (*Soil*), como otros autores han detectado previamente (Ros *et al.*, 2003; Ros *et al.*, 2006; Bastida *et al.*, 2008; Lambais y do Carmo, 2008; Singh y Agrawal, 2008), existiendo una relación dependiente entre ellas (Tabla 17, Tabla 18 y Figura 25). Esa relación es predecible puesto que cuando la biomasa aumenta se supone que existen más microorganismos y por esa razón, la respiración se incrementa (Luo y Zhou, 2006b; Brockett *et al.*, 2011).

Nuestros datos indican, además, que el aumento de la biomasa microbiana en las parcelas tratadas con lodos de depuradora se mantuvo hasta 2 años después de la aplicación de los lodos y fue más patente en aquellas en las que se usó una menor dosis de lodo aerobio ( $40 \text{ t ha}^{-1}$ ). De forma similar, se ha detectado previamente un aumento de la biomasa en suelos tratados con lodos anaerobios frescos ( $10 \text{ t ha}^{-1}$ ) que se mantuvo incluso 401 días (Tarrasón *et al.*, 2010) o tres años después de su aplicación (Tejada *et al.*, 2009), al igual que en experimentos realizados tanto a largo como a corto plazo (García-Gil *et al.*, 2000; Saison *et al.*, 2006).

Sin embargo, no parece existir aún un consenso en la comunidad científica sobre los posibles efectos en la biomasa microbiana, puesto que algunos estudios no han detectado diferencias significativas en los datos de biomasa microbiana entre muestras de suelo enmendadas con distintos tipos de residuos orgánicos y el suelo control sin tratamiento (García-Gil *et al.*, 2004; Calbrix *et al.*, 2007). Además, existen trabajos en los que se afirma que el aumento de la biomasa en suelos agrícolas tratados con lodos de depuradora parece ser un efecto temporal puesto que estas alteraciones solo fueron observadas en las primeras semanas después de la aplicación (Debosz *et al.*, 2002) o no se observaron diferencias en las mediciones de biomasa entre las muestras de suelo tratadas con distintos residuos orgánicos y el suelo control (Franco-Otero *et al.*, 2012).

La respiración basal es un parámetro sensible para monitorear la mineralización de la materia orgánica del suelo (García y Hernández, 1996). En nuestros experimentos hemos comprobado un incremento en la tasa de respiración, principalmente en los suelos tratados con menor dosis de lodo aerobio ( $40 \text{ t ha}^{-1}$ ) incluso 2 años después de su aplicación, de manera similar a lo detectado para la biomasa. Otros autores, usando una dosis similar de lodos de depuradora en suelos agrícolas,  $40 \text{ t ha}^{-1}$ , detectaron un incremento de la tasa de respiración 9 meses después de la aplicación de los lodos que disminuyó 36 meses después (García-Gil *et al.*, 2004). De forma análoga, se encontró una mayor tasa de respiración en suelos tratados con  $45 \text{ t ha}^{-1}$  de enmiendas orgánicas municipales respecto al suelo control. En este caso, las tasas de respiración se mantuvieron elevadas incluso tres años después de la aplicación. Ese efecto fue atribuido al crecimiento microbiano y al estímulo de la actividad microbiana por la adición de lodos de depuradora al suelo y además, al posible cambio en la composición de la comunidad microbiana (Iovieno *et al.*, 2009). Además, se detectaron mayores niveles de respiración basal en suelos tratados con lodos de depuradora secos y compostados (Ros *et al.*, 2006; Franco-Otero *et al.*, 2012) y en suelos tratados con estiércol de ganado frente a un suelo control (Enwall *et al.*, 2007).

***¿Es el incremento de la biomasa y de la respiración microbiana dependiente de la dosis utilizada? ¿A qué se debe este incremento?***

El incremento de la biomasa y de la respiración dependió de la dosis y del tipo de lodo utilizado. Así, la dosis que produjo ese mayor aumento fue la de  $40 \text{ t ha}^{-1}$  y especialmente, el lodo aerobio. En las parcelas tratadas con mayores dosis de lodos (AE160 y ANAE160), sin embargo, la biomasa y la respiración presentaron valores similares o incluso inferiores a los detectados en el suelo control (*Soil*). Por tanto, el incremento de la respiración y de la biomasa del suelo parece depender del tipo de fertilizante y de las condiciones del suelo en el que está siendo aplicado (Luo y Zhou, 2006a), aunque la cantidad también parece ser importante (Tejada *et al.*, 2009).

El incremento de la biomasa y respiración puede ser debido a dos razones. Una de ellas podría ser la presencia de compuestos de carbono fácilmente degradables en los lodos de depuradora. Como, por ejemplo, sustancias orgánicas lábiles que podrían estimular la actividad microbiana autóctona del suelo (Perucci, 1992; De Nobili *et al.*, 2001; Ros *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2007; Odlare *et al.*, 2008; Tejada *et al.*, 2009). Según la literatura, el incremento de la biomasa microbiana y de la respiración del suelo va a depender de la cantidad y de la calidad de materia orgánica añadida (Tejada *et al.*, 2009). Por lo tanto, la población microbiana del suelo podría ser capaz de utilizar las sustancias orgánicas lábiles introducidas en los suelos tratados con menores dosis de lodos (Tarrasón *et al.*, 2010), mientras que las dosis más elevadas podrían ejercer efectos tóxicos sobre la población microbiana debido a la gran concentración de esas fuentes de carbono u otras sustancias. Nuestros resultados sugieren que pudiera existir un límite de concentración por encima del cual los lodos son perjudiciales para la microbiota y el suelo.

Otra razón podría ser atribuida a la adición de un exceso de nitrógeno al suelo al incrementar la dosis de lodo aplicada. Hemos detectado una relación entre la razón carbono soluble-nitrógeno soluble ( $C_{\text{sol}}:N_{\text{sol}}$ ) en los suelos tratados con mayores dosis de lodo en junio de 2009 (T6) y las muestras del suelo control (*Soil*). La explicación en



el caso del suelo control residiría en que presenta una baja concentración de nitrógeno, característica de los suelos mediterráneos (Ochoa-Hueso *et al.*, 2011). Esta baja concentración de nitrógeno suele ser atribuida al incremento de la temperatura, característico de los meses de verano en este clima, que aumenta la mineralización del nitrógeno y como consecuencia, la emisión de óxido nitroso (Peterjohn *et al.*, 1994). En el caso de las parcelas tratadas con grandes cantidades de lodos de depuradora, la relación con la razón  $C_{sol}:N_{sol}$  se debería a una menor utilización de ese carbono soluble, lo que explicaría la menor respiración y biomasa detectada en estas parcelas comparativamente con las de menor dosis. En las parcelas tratadas con menor dosis de lodo se observa una relación opuesta con la razón  $C_{sol}:N_{sol}$  sugiriendo que se podría producir una mayor emisión de  $CO_2$ , pero también del nitrógeno en forma de óxido nitroso ( $N_2O$ ) a la atmósfera. La reducción de la cantidad de carbono en las parcelas tratadas con menores dosis de lodo podría contribuir al incremento de la emisión de  $CO_2$  a la atmósfera (Mondini y Sequi, 2008), como se ha descrito para los suelos tratados con fertilizantes orgánicos o minerales ricos en nitrógeno (Granli y Bockman, 1994; Mosier, 1998; Amlinger *et al.*, 2003). Además de estos factores, hemos detectado que tanto las características del suelo en cada muestreo como el tratamiento influyeron significativamente en los valores de biomasa, mientras que el tipo de tratamiento utilizado fue el más influyente en las tasas de respiración (Tabla 19). Además, la biomasa y la respiración están relacionadas positivamente con la temperatura y negativamente con la humedad (Tabla 17, Tabla 18, Figura 25 y Figura 29). Conjuntamente, la temperatura y la humedad parecen producir cambios temporales en las propiedades de la comunidad microbiana del suelo que pueden influir significativamente en su respiración (Fierer y Schimel, 2002; Feng *et al.*, 2003; Austin *et al.*, 2004; Luo y Zhou, 2006c; Han *et al.*, 2007). Contrariamente a nuestros resultados, otros autores indican que la actividad enzimática, la biomasa y la respiración microbiana se incrementan cuando existe una mayor humedad en el suelo (Fierer y Schimel, 2002; Austin *et al.*, 2004).

#### ***¿A qué se debe esa diferencia en las mediciones de biomasa y respiración en los suelos tratados con lodos?***

Hemos comprobado que existe una relación inversa entre el incremento en la dosis utilizada y el incremento de la respiración y la biomasa microbiana. Así, ese incremento dependiente de la menor dosis podría ser explicado de otra manera. En las parcelas tratadas con menor dosis ( $40\text{ t ha}^{-1}$ ) se introdujo una menor cantidad de materia orgánica en el suelo lo que posiblemente estimuló la respiración aeróbica por parte de los microorganismos, liberando así una mayor cantidad de dióxido de carbono a la atmósfera. En cambio, el incremento progresivo de la dosis de lodo aumentaría la cantidad de materia orgánica en el suelo lo que podría haber favorecido el metabolismo fermentativo de los microorganismos. De esta manera, los microorganismos producirían un efecto similar al efecto *Crabtree* que ocurre más frecuentemente en levaduras (Pronk *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2006). Este fenómeno, que se ha detectado en enterobacterias (Mustea y Muresian, 1967), ha sido relacionado con la acetogénesis como una manera de incrementar el crecimiento de biomasa (Wolfe, 2005) y se ha descrito en bacterias que forman biopelículas durante la fermentación de los lodos de depuradora (Thierie y Penninckx, 2004).

### 2.6.1.2 EFECTO DE LOS LODOS EN LOS RECIENTOS DE MICROORGANISMOS.

Los microorganismos que forman parte del suelo son en su mayoría, microorganismos heterotróficos que dependen del carbono orgánico (como, por ejemplo, diversos azúcares o almidón) para obtener energía y sobrevivir (Odlare *et al.*, 2008; Chakraborty *et al.*, 2011). Cuando algunos residuos orgánicos como los lodos de depuradora son utilizados como fertilizantes en suelos agrícolas, generalmente se incrementa la población microbiana del suelo y la diversidad de ésta (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006; Calbrix *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, hemos detectado un aumento en la cantidad de microorganismos que está relacionado con el incremento de la dosis de lodo aplicada en el suelo, tanto en el caso de los microorganismos oligotróficos (R2A, ETD y R2AC) como en el de los copiotróficos (Agar Actinomicetos y Sabouraud-Cloranfenicol), como ha sido publicado previamente (de las Heras *et al.*, 2005; Wallace *et al.*, 2009).

Inversamente a lo detectado en el caso de la biomasa y la respiración microbiana, el incremento del número de microorganismos oligotróficos y copiotróficos totales fue más patente en las muestras tratadas con mayores dosis de lodos (AE160 y ANAE160) (Figura 11, Figura 12 y Figura 13) y, en concreto, en las tratadas con lodo aerobio. Ese mayor número de microorganismos se mantuvo hasta 2 años después de la aplicación de los lodos, comprobándose una relación clara entre el incremento de la dosis y el incremento en el número de microorganismos analizados (Figura 26 y Figura 30).

El efecto dosis-dependiente en los recuentos microbianos ha sido descrito en otros estudios. Por ejemplo, el número de microorganismos copiotróficos y oligotróficos se incrementa en hasta un 83 % y de bacterias al aumentar la dosis aplicada (Hu *et al.*, 1999; Wolna-Maruwka *et al.*, 2007; Jezierska-Tys y Frac, 2008; Jezierska-Tys *et al.*, 2010). En el caso de menores concentraciones de lodo anaerobio ( $8 \text{ t ha}^{-1}$  y  $24 \text{ t ha}^{-1}$  de biosólidos de clase B), el número de microorganismos copiotróficos fue superior en los suelos enmendados con mayor dosis de lodo (Lawlor *et al.*, 2000; Zerzghi *et al.*, 2010). Otros tipos de residuos procedentes de una fábrica de cuero también produjeron un incremento gradual del número de microorganismos totales con el incremento de la dosis aplicada (Nakatani *et al.*, 2011).

Respecto al número de **bacterias** oligotróficas (R2AC), los valores en las muestras tratadas con mayores dosis de lodo (AE160 y ANAE160) fueron superiores en la mayoría de los análisis, siendo aún más elevado en el caso del anaerobio. En un ensayo de PCR cuantitativa hemos comprobado que ANAE160 presentó un mayor número de copias del gen 16S (llegando a ser 6 veces superior a las otras muestras) incluso dos años después de la aplicación de los lodos (Navarro-García y Kowalchuk, datos no publicados).

Comparando los resultados en R2A y en R2AC, se observa que en R2A existe, en general, un mayor número de microorganismos oligotróficos en las muestras de AE160 mientras que en R2AC, un mayor número de bacterias oligotróficas en las de ANAE160. Se podría atribuir la diferencia entre ambos medios a los **hongos**, puesto que en las muestras de AE160 se detecta un mayor número de estos microorganismos

(Sabouraud Cloranfenicol). De la misma manera que los recuentos de microorganismos oligotróficos y copiotróficos son dependientes de la dosis de lodo aplicada, los hongos también demostraron serlo (Figura 15, Figura 26 y Figura 30), como han descrito otros autores (Joniec y Furezak, 2008; Jezierska-Tys y Frac, 2008). El incremento del número de hongos también ha sido detectado al utilizar distintos tipos de lodos de depuradora hasta 6 meses después de su aplicación (Kacprzak y Stanczyk-Mazanek, 2003). Aunque el número de hongos se incrementa por la adición de los lodos, hemos detectado que las características del suelo son las que más influyen en el recuento de estos microorganismos comparado con el tratamiento de lodo utilizado (Tabla 19).

### ***¿A qué se debe ese incremento en los recuentos de microorganismos?***

El incremento del número de microorganismos totales en las parcelas de suelo tratadas con lodos de depuradora podría ser debido a varias razones. Una de ellas podría ser que los lodos de depuradora están formados por compuestos orgánicos que estimulan la actividad microbiana del suelo (Kuntz *et al.*, 2008). En las parcelas de suelos tratadas con lodos de depuradora, se comprobó que el tratamiento de lodo utilizado se correlacionó con el número de microorganismos (Tabla 19), principalmente en las parcelas tratadas con mayores dosis de lodo (AE160 y ANAE160) (Figura 26 y Figura 30). En general, el incremento de la cantidad de materia orgánica y otros nutrientes (nitrógeno, fósforo y calcio) aumenta el número de los microorganismos del suelo (de las Heras *et al.*, 2005; Wallace *et al.*, 2009). Este efecto fue evidenciado en nuestro trabajo por la asociación entre el incremento de la dosis de lodo aplicada y del carbono soluble con el incremento del número de microorganismos oligotróficos y copiotróficos (Figura 26 y Figura 30). También hemos observado una cierta relación con la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo (Figura 30). La CIC se define como la capacidad que tiene el suelo de intercambiar y almacenar cationes como, por ejemplo, calcio, potasio, magnesio y sodio (Minz *et al.*, 2011). La mayor capacidad de intercambio catiónico se correlaciona con la mayor cantidad de materia orgánica y con la textura del suelo, por lo que se trata de un importante indicador de fertilidad (Sombroek *et al.*, 1993; Franco-Hernandez *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2006). Parece existir una asociación entre el incremento de la dosis de lodo aplicada y el incremento de la capacidad de intercambio catiónico en suelos tratados con lodos (Hemmat *et al.*, 2010), de forma similar a nuestros resultados (Figura 30).

Otra de las razones por las que el número de microorganismos aumenta en los suelos tratados con lodos podría ser el aumento de la capacidad de almacenamiento de agua del suelo por la aplicación del lodo, puesto que cuanto mayor fue la dosis aplicada, mayor fue el porcentaje de humedad por regla general (Figura 7). Existe una relación directa entre el incremento de la humedad y el incremento de la mayoría de los recuentos de microorganismos analizados en el estudio (Tabla 17, Tabla 18 y Figura 30), como se ha sugerido previamente (Austin *et al.*, 2004; Lang y Smith, 2007; Bell *et al.*, 2008; Zerkhi *et al.*, 2010; Hueso *et al.*, 2011). Según la literatura, los lodos de depuradora incrementan la capacidad del suelo de almacenar y/o retener agua optimizando las propiedades físicas, la porosidad y el incremento de la materia orgánica en ese ecosistema, produciendo un aumento de la actividad microbiana (Ros *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2007; Lang y Smith, 2007; Bell *et al.*, 2008; Singh y Agrawal, 2008; Wang *et al.*, 2008), puesto que en los periodos de sequía esa actividad disminuye considerablemente (Austin *et al.*, 2004; Paul, 2007; Lang y Smith, 2007).

Otras posibles razones para el incremento de estos microorganismos en el suelo podrían estar asociadas con los aspectos ambientales característicos en cada muestreo. De entre estos aspectos, la temperatura y el pH podrían afectar directamente la comunidad microbiana del suelo (Brockett *et al.*, 2011). Sin embargo, según nuestros resultados el tratamiento aplicado (tipo y dosis) fue más influyente que los aspectos ambientales (Figura 26, Figura 30 y Tabla 19).

***¿Por qué existe una discrepancia entre los datos de recuentos de microorganismos y la biomasa microbiana? ¿Cuál es el mejor método para determinar los cambios en la microbiota del suelo por la adición de los lodos?***

Cuando comparamos los resultados de los recuentos de microorganismos oligotróficos y copiotróficos y de la biomasa comprobamos que existe una discrepancia entre estos datos, puesto que la biomasa fue mayor en AE40, mientras que los recuentos de microorganismos fueron mayores en AE160 y ANAE160. Esa discrepancia puede deberse a que ambos métodos son totalmente distintos. El recuento de microorganismos en medios de cultivo es una técnica universal, rápida y barata utilizada para estimar parte de la población de muestras de diversos tipos (Tabacchioni *et al.*, 2000; Reasoner, 2004). Sin embargo, la proporción bacteriana del suelo que es capaz de crecer en un medio de cultivo es baja, oscilando entre 0,1 y 1 %, debido a que muchos microorganismos no son capaces de crecer bajo las condiciones impuestas en el laboratorio (Faegri *et al.*, 1977; Lynch y Hobbie, 1988; Ward *et al.*, 1990; Torsvik *et al.*, 1998). Por tanto, las limitaciones del método de recuento en placas junto con la gran diversidad microbiana constituyen un gran problema en la estimación de la población microbiana del suelo (Torsvik *et al.*, 1998; Lawlor *et al.*, 2000). En cambio, el método que hemos utilizado para medir la biomasa se basa en la liberación del CO<sub>2</sub> producido por microorganismos durante 4 horas tras un estímulo metabólico (Fierer *et al.*, 2003b). En este ensayo se analizan los microorganismos de metabolismo rápido que respiran aeróbicamente, generalmente bacterias. El experimento realizado mediante PCR cuantitativa apoyaría los datos de los recuentos de microorganismos, puesto que hemos identificado un mayor número de copias de genes 16S en las muestras de mayor dosis, sobre todo en ANAE160 (Navarro-García y Kowalchuk, datos no publicados). Sin embargo, esta técnica también tiene sus limitaciones, puesto que mediante ese método se detecta tanto el DNA de bacterias vivas como el de las muertas (fragmento 16S), y el número de copias de ese gen es variable entre las distintas especies (Paul, 2007).

Por tanto, a nuestro juicio, la unión de dichos métodos es la mejor forma de intentar estimar la población microbiana del suelo y detectar sus variaciones en suelos tratados con lodos de depuradora, puesto que todas esas técnicas tienen sus ventajas y desventajas. Sin embargo, aunque se utilicen diversos métodos no es posible estimar toda la población microbiana que compone el suelo, puesto que la variabilidad funcional y ecológica es muy amplia (Wellington y Elsas, 1992; Nannipieri *et al.*, 2003; Schloss y Handelsman, 2006).

## 2.6.2 ¿SE TRANSMITEN Y MANTIENEN DETERMINADOS PATÓGENOS ENTÉRICOS EN LOS SUELOS TRAS LA ADICIÓN DE LODOS?

Los residuos orgánicos como los lodos de depuradora contienen en su composición excretas humanas en las cuales pueden existir microorganismos entéricos patógenos, incluyendo bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Enterococcus spp.* y Gram-positivas como *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes* (Garrec *et al.*, 2003; Estrada *et al.*, 2004; Karpowicz *et al.*, 2009). La utilización de estos residuos orgánicos como enmiendas en suelos agrícolas podría producir serias consecuencias para la salud humana, puesto que estos microorganismos patógenos pueden acumularse y persistir en los suelos, dependiendo de las condiciones presentes en ellos (United States Environmental Protection Agency, 1995; Grøn *et al.*, 2007; Lang y Smith, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

Hemos detectado la presencia de bacterias patógenas de origen fecal en mayor número en aquellas parcelas de suelo tratadas con mayor dosis de lodo. La presencia de esas bacterias patógenas se debe muy probablemente a su presencia en los lodos utilizados en ese estudio, puesto que en ellos se detectaron niveles importantes de bacterias patógenas de origen fecal, principalmente de coliformes fecales que sobrepasaron los límites permitidos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) (Figura 16). Otra razón para el incremento del número de esas bacterias radica en el incremento de los nutrientes y la humedad en los suelos tratados con los lodos, al igual que ocurre en el caso de los microorganismos copiotróficos.

Los niveles de esas bacterias patógenas en nuestras muestras disminuyeron con el tiempo, aunque no desaparecieron totalmente, manteniéndose incluso 2 años después de la aplicación de los lodos en las parcelas tratadas con dosis intermedias y altas (AE80 y ANAE80; AE160 y ANAE160), sugiriendo una contaminación de estos suelos de forma dosis-dependiente (Figura 27). Así, se detectó un mayor número de patógenos entéricos (coliformes totales, fecales y *Salmonella*) en muestras de suelo tratadas con mayores dosis de lodo (de las Heras *et al.*, 2005; Zerzghi *et al.*, 2010; Jezierska-Tys *et al.*, 2010).

En cuanto a la persistencia, los patógenos entéricos introducidos en el suelo durante la aplicación de LDAR pueden mantenerse estables durante 2 o más meses (United States Environmental Protection Agency, 1995). Así, se han detectado patógenos entéricos (coliformes totales, fecales y *Salmonella*) en suelos tratados con lodos después de 84 días (Sun *et al.*, 2006), 90 días (de las Heras *et al.*, 2005) y 10 meses (Zerzghi *et al.*, 2010). Otro estudio indicó la disminución del número de coliformes fecales a los 91 días de la aplicación de lodos anaerobios a un suelo agrícola afirmando que la temperatura y la humedad no fueron los factores primordiales para la supervivencia de esas bacterias, sugiriendo que otras propiedades del suelo, como por ejemplo, la materia orgánica, podrían haber influido en la presencia de esas bacterias (Lang y Smith, 2007).

La diferencia de nuestros resultados con los de estos trabajos podría residir en que utilizamos distintos lodos (aerobios y anaerobios), distintas cantidades (entre 2 y 16 veces superiores en comparación con los otros trabajos (Zerzghi *et al.*, 2010)) o en

la frecuencia de la aplicación de estos a los suelos (una sola vez frente a aplicaciones repetidas (de las Heras *et al.*, 2005)).

Sin embargo, no todos los patógenos analizados se comportaron de la misma manera. Los clostridios presentaron un comportamiento distinto que se podría atribuir a que son bacterias que se encuentran comúnmente en el suelo (Karpowicz *et al.*, 2009). Respecto al efecto del tipo del lodo en el número de clostridios, podríamos presuponer que los lodos anaerobios incrementarían el número de clostridios sulfitorreductores detectados tras la aplicación al suelo, puesto que la digestión anaerobia de estos residuos favorece el crecimiento de bacterias anaerobias (Matches *et al.*, 1974; Rivièrè *et al.*, 2009). Efectivamente, el número de clostridios fue superior en las parcelas tratadas con este tipo de lodo (Figura 19) aunque, paradójicamente, el número total en el lodo anaerobio fue dos órdenes de magnitud menor al que encontramos en el lodo aerobio (Figura 16).

A pesar de que la presencia de estas bacterias patógenas de origen fecal en nuestros ensayos está claramente asociada con la aplicación de los lodos, también las hemos identificado en el suelo control en algunos muestreos, lo que sugeriría que son parte de la microbiota autóctona del suelo. Otros autores han identificado la presencia de origen natural de esas bacterias en suelos de climas tropicales y subtropicales en los cuales las temperaturas y humedad son bastante elevadas (Byappanahalli y Fujioka, 2004; Ishii *et al.*, 2006; Goto y Yan, 2011), y en algunos suelos agrícolas del Reino Unido en condiciones de extrema sequía (Lang y Smith, 2007). Otra posible justificación para la presencia de esas bacterias en el suelo control podría ser la contaminación por heces de pájaros o pequeños mamíferos (Lang y Smith, 2007), aunque deberían estar presentes en todos los muestreos (algo que no ocurre para los coliformes en T2, T4, T5 y T6).

### ***¿Qué parámetros ambientales influyen en la permanencia de los patógenos en los suelos tratados?***

Tanto la disminución como la supervivencia de bacterias patógenas en el suelo podría estar influida por diversos aspectos ambientales como la textura del suelo, la cantidad de materia orgánica, la composición, la microbiota autóctona, el pH, la temperatura o la humedad (Garrec *et al.*, 2003; Austin *et al.*, 2004; Lang y Smith, 2007). De entre estos aspectos, la cantidad de agua presente parece ser el principal factor que influye en la presencia y persistencia de esas bacterias en el suelo (Gerba y Bitton, 1994), puesto que la desecación podría producir la autólisis de las células bacterianas (Fenlon *et al.*, 2000), aunque las bacterias pueden sobrevivir mediante la producción de polisacáridos extracelulares como mecanismo de adaptación (Or *et al.*, 2007). En nuestros resultados, hemos detectado que el incremento del recuento de las bacterias patógenas de origen fecal analizadas (principalmente los clostridios y enterococos) se relacionó con el incremento de la humedad, precipitación y temperatura (Figura 27), así como con las características del suelo en cada muestreo (Tabla 19). A pesar de que los coliformes fecales y enterococos son capaces de adaptarse y sobrevivir a altas temperaturas (Martinez *et al.*, 2003; Rudolph *et al.*, 2010), quizás no puedan resistir una disminución en la disponibilidad regular de agua, fenómeno común en el clima mediterráneo (de Paz *et al.*, 2006), por lo que el incremento y persistencia de la humedad promovido por la presencia de los lodos, favorecería el mantenimiento de estos patógenos.

Otro de los aspectos relevantes, como es la cantidad y composición de la materia orgánica, que influye en el incremento de los microorganismos copiotróficos a través del aumento en la fracción de carbono soluble (Figura 30), también se manifiesta en el incremento del número de bacterias patógenas en los suelos tras la adición de los lodos por un aumento en la cantidad de los compuestos fácilmente degradables (Lp1), aunque de manera menos significativa (Figura 31).

La textura del suelo también podría justificar la presencia de esas bacterias patógenas incluso después de dos años de análisis. Los suelos ricos en arcilla pueden ser favorables para el mantenimiento de esas bacterias. Estos tipos de suelo proporcionan un ambiente más adecuado para mantener la biomasa microbiana, incrementando el periodo de supervivencia de bacterias entéricas como los coliformes totales y fecales (Fenlon *et al.*, 2000; Cools *et al.*, 2001; Lang y Smith, 2007). En cambio, los suelos arenosos son más agresivos para las bacterias entéricas y están más sujetos a la desecación (Fenlon *et al.*, 2000). Sin embargo, se detectó una mayor cantidad de coliformes en suelos arenosos con un menor porcentaje de arcilla (8%) comparado con suelos con un 36% de arcilla (Lang y Smith, 2007), mientras que otros suelos con alto contenido de arcilla fueron favorables para el mantenimiento sobre todo de *Enterococcus* sp. (Cools *et al.*, 2001). En nuestro suelo agrícola el porcentaje de arcilla alcanzó un 27,3% (Tabla 1) y, como en el último caso, hemos detectado más bacterias del género *Enterococcus* sp. que de *Escherichia coli* (Figura 17 y Figura 18). De entre ellas, las del género *Enterococcus* spp. se mostraron más persistentes que *Escherichia coli* en suelos tratadas con estiércol de cerdos (Cools *et al.*, 2001).

### 2.6.3 LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA INCREMENTA EL NÚMERO Y LA PROPORCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A AMPICILINA EN EL SUELO AGRÍCOLA.

La resistencia a antibióticos es un proceso tan extendido en la naturaleza como la propia existencia de los mismos. De hecho, la existencia en ambientes prístinos de microorganismos resistentes a varios antibióticos e incluso a antibióticos sintéticos ha sido puesta de manifiesto por diversos autores (Riesenfeld *et al.*, 2004; Guardabassi y Agerso, 2006; Allen *et al.*, 2008; Dantas *et al.*, 2008). La razón de la existencia de mecanismos de resistencia parece ser un método de autoprotección aunque podrían tener otras funciones como la detoxificación de sustancias diversas (Martínez *et al.*, 2009). Estos mecanismos están relacionados con la competición por nutrientes, el estrés ambiental y la producción de antibióticos por algunas bacterias del suelo (Killham y Prosser, 2007).

La producción de antibióticos a gran escala y su uso excesivo conlleva un incremento notable de la concentración de estos compuestos y sus metabolitos en el medio ambiente con la consecuente selección de bacterias resistentes a antibióticos (Seveno *et al.*, 2002; Kümmerer, 2004). Los antibióticos utilizados en la medicina veterinaria con fines antiinfecciosos también son consumidos para estimular su crecimiento, por lo que pueden ser liberados al medio ambiente por el uso de estiércoles animales como fertilizantes orgánicos en los suelos (Silbergeld *et al.*, 2008). De la misma manera, la presencia en efluentes de hospitales, plantas de tratamientos de agua, aguas superficiales y subterráneas, y los lodos obtenidos a partir de su depuración puede provocar que lleguen a los suelos agrícolas (Richardson y Bowron, 1985; Dahlberg *et al.*, 1998; Zuccato *et al.*, 2000; Golet *et al.*, 2001; Sacher *et al.*, 2001; Kolpin *et al.*, 2002; Kümmerer, 2003; Popowska *et al.*, 2010). La presencia de estos antibióticos en el suelo puede causar cambios en su microbiota y además, inducir la selección de nuevas formas de resistencia (Kemper, 2008).

En nuestros resultados, la aplicación de lodos de depuradora en el suelo incrementó la cantidad de las bacterias resistentes a ampicilina ( $32$  y  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), persistiendo con valores muy similares a lo largo de 2 años sin detectar una disminución significativa en el número de esas bacterias en las muestras tratadas con mayor dosis de lodo (Figura 20 y Figura 21). Previamente se ha descrito un incremento no significativo de la resistencia a ampicilina y a otros antibióticos (cefalotina, ciprofloxacina y tetraciclina) en suelos tratados con lodos de depuradora anaerobios (biosólidos de clase B) (Brooks *et al.*, 2007b; Zerzghi *et al.*, 2010). En el caso de la resistencia a concentraciones más elevadas de ampicilina ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), hemos detectado una mayor cantidad de bacterias resistentes en las parcelas tratadas con lodos, especialmente en las de mayor dosis, tras el primer año (junio de 2008 – T3) que disminuyó en aproximadamente un orden de magnitud durante el siguiente año (Figura 22). En este último caso, hemos observado una cinética distinta puesto que no se detectaron diferencias significativas entre los suelos tratados con lodos y el control (Soil) en los tres últimos análisis (Figura 22).

***¿El incremento del recuento de bacterias resistentes a ampicilina es dependiente del tipo y de la dosis de lodo aplicada? ¿Los parámetros ambientales podrían influir en la población de bacterias resistentes presentes en el suelo?***



Hemos detectado un mayor número y porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina en las parcelas tratadas con mayor cantidad (160 t ha<sup>-1</sup>) de lodo aerobio (Figura 20, Figura 21, Figura 22, Figura 23 y Figura 24), dependiendo así de la dosis (Figura 28) y del tipo de lodo aplicado. Una justificación para que exista una mayor cantidad de estas bacterias podría estar asociada a la presencia de antibióticos o bacterias resistentes a éstos en los lodos de depuradora (Gaze *et al.*, 2008; Kümmerer, 2008; Hölzel *et al.*, 2010), como en nuestro caso, en el que hemos detectado niveles importantes de bacterias resistentes a 32 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina en los lodos, sobre todo en el aerobio ( $1,38 \times 10^9 \pm 0,183$  CFU g<sup>-1</sup> suelo). De la misma manera, se han identificado previamente grandes cantidades de bacterias resistentes a diversos antibióticos y altas concentraciones de genes de resistencia a tetraciclina y sulfonamida (Tet-W, Tet-O y Sul-I) en estiércol de cerdo, en lodos de depuradora (biosólidos de clase B) y, posteriormente, en los suelos tratados con estos residuos (Reinthaler *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2007b; Hölzel *et al.*, 2010; Munir y Xagorarakis, 2011; Munir *et al.*, 2011).

El incremento del número de bacterias resistentes a ampicilina en los suelos tratados con lodos podría ser atribuido a la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos. Ese fenómeno ocurre probablemente de manera natural en el suelo o en suelos tratados con lodos de depuradora o estiércol animal o incluso, en plantas de tratamiento de agua (Smalla *et al.*, 2000; Aminov *et al.*, 2001; Heuer y Smalla, 2007; Gaze *et al.*, 2008) favoreciendo así, la rápida diseminación de la resistencia entre diferentes especies de microorganismos (D'Costa *et al.*, 2006; D'Costa *et al.*, 2007). De hecho, se ha sugerido que el uso de estiércol como fertilizante orgánico en el suelo puede ser la ruta principal de diseminación de genes de resistencia a antibióticos (Schmitt *et al.*, 2006; Heuer y Smalla, 2007) (BINH2008 /id}.

Además de la influencia de los lodos, algunos aspectos ambientales podrían también ejercer efectos en el número de bacterias resistentes a ampicilina en el suelo, como, por ejemplo, las características hidrológicas, la textura del suelo, la humedad, el pH o el contenido de materia orgánica del suelo (Sarmah *et al.*, 2006; Singer *et al.*, 2006; Kemper, 2008). De entre estos factores, la textura del suelo puede ser importante puesto que se ha comprobado un incremento en la adhesión de cepas de *Escherichia coli* resistentes a betalactámicos a partículas de cuarzo (Liu *et al.*, 2011a). Otro factor que podría estimular aún más la resistencia, es la capacidad de las propias partículas de suelo de adsorber los antibióticos. Para ello, el contenido de arcilla y materia orgánica principalmente podrían favorecer esa adsorción (por ejemplo, de tetraciclina) (Tolls, 2001; Subbiah *et al.*, 2011). En nuestros resultados hemos detectado la influencia de algunos parámetros ambientales (humedad y precipitación) en el número de bacterias resistentes a ampicilina (32 y 64 µg mL<sup>-1</sup>) (Figura 28). Además, la influencia de las características del suelo en el número de bacterias resistentes fue más patente cuando evaluamos la resistencia a concentraciones más elevadas de ampicilina (64 µg mL<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup>), que en las poblaciones resistentes a 32 µg mL<sup>-1</sup> en las cuales el tratamiento tiene una influencia ligeramente superior (Tabla 19). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que analicen la influencia de los parámetros ambientales en la población de microorganismos resistentes después de añadir los lodos de depuradora.

Otra razón para el incremento del número de bacterias resistentes podría estar relacionada con la presencia de contaminantes en el suelo. Entre ellos, los metales pesados que podrían estimular la resistencia a antibióticos y causar modificaciones en la microbiota autóctona y en sus funciones (Holzel *et al.*, 2012), puesto que los microorganismos desarrollan mecanismos para adaptarse a esas condiciones que están asociados con los desarrollados para la resistencia a antimicrobianos (Levy, 2002a; Nies, 2003; Alam *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestras parcelas no presentaron niveles elevados de metales pesados (Puigdueta, González-Ubierna, de la Cruz, Casermeiro, datos preliminares).

Aunque los lodos claramente influyen en la presencia y mantenimiento de bacterias resistentes a ampicilina en las parcelas enmendadas, también hemos detectado este tipo de bacterias en el suelo control (Soil) y en algunos casos en cuantía similar a la alcanzada con dosis bajas de lodos de depuradora (64 µg mL<sup>-1</sup> y 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina) (Figura 21 y Figura 22). Existen diversas explicaciones para este fenómeno, entre las que destaca la selección que produce la presencia natural de antibióticos (estreptomicina y tetraciclina, por ejemplo) o la presencia e intercambio de genes de resistencia en las poblaciones naturales del suelo (Kümmerer, 2004; D'Costa *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2007b; Allen *et al.*, 2008; Dantas *et al.*, 2008; Gaze *et al.*, 2008; Zerzghi *et al.*, 2010; Wright, 2010; Munir y Xagorarakis, 2011; Sengupta *et al.*, 2011; Monier *et al.*, 2011), lo que explicaría que sólo las características del suelo influyeran significativamente en los recuentos de bacterias resistentes a mayores dosis de ampicilina (1 g L<sup>-1</sup>) (Tabla 19).

#### 2.6.4 ¿ES AMBIENTAL Y SANITARIAMENTE SEGURO UTILIZAR LODOS DE DEPURADORA URBANA COMO ENMIENDA AGRÍCOLA?

Actualmente en España, el 65 % de los lodos de depuradora generados son utilizados como enmiendas agrícolas en suelos mediterráneos (Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009). Según la literatura, esa es la mejor forma de reciclar los lodos y de incrementar la materia orgánica del suelo (Franco-Hernandez *et al.*, 2003; Grøn *et al.*, 2007; Gomez-Rico *et al.*, 2008) y de intentar recuperar suelos degradados (Ros *et al.*, 2003; Sardans *et al.*, 2006; Bastida *et al.*, 2009). Sin embargo, esa aplicación debe ser controlada puesto que hemos comprobado que los valores de bacterias patógenas y resistentes a ampicilina se incrementaron sobre todo en las muestras de suelo tratadas con la dosis de lodo más elevada ( $160 \text{ t ha}^{-1}$ ), manteniéndose incluso dos años después de la aplicación, por lo que no está exenta de efectos peligrosos. Aunque en nuestro caso la presencia y permanencia de esos agentes dependió tanto de los parámetros ambientales propios de cada muestreo como del tratamiento de lodo utilizado de manera distinta, la distinta composición del lodo en microorganismos patógenos, metales pesados, antibióticos y otras sustancias tóxicas para el ser humano hace que deban ser evaluados antes de su utilización (Tchobanoglous *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2008; Zerzghi *et al.*, 2010).

No obstante, incluso a dosis bajas pueden existir problemas ya que hemos observado que se produce un incremento de la tasa de respiración (AE40), mostrando ser la dosis más perjudicial en cuanto a la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera en un tiempo relativamente largo (dos años de análisis). Según la literatura, el uso de lodos en el suelo facilita el secuestro del carbono (Smith *et al.*, 2000; Smith, 2004) pero también se ha descrito, y nosotros hemos comprobado con nuestros resultados, que la utilización de residuos orgánicos en suelos agrícolas puede estimular la mineralización del carbono y como consecuencia, la emisión de gases de efecto invernadero como, por ejemplo, el metano y el  $\text{CO}_2$  a la atmósfera (Insam y Wett, 2008; Diacono y Montemurro, 2010), lo que podría contribuir al aumento del cambio climático que actualmente genera mucha inquietud y preocupación (Hunter, 2008). De forma similar a nuestros resultados, otros autores han detectado un incremento de la emisión de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera en suelos tratados con distintas dosis de lodos de depuradora (Paramasivam *et al.*, 2008; Fernández-Luqueño *et al.*, 2009; Mattana *et al.*, 2010). Sin embargo, no solamente se produce un incremento en la emisión de  $\text{CO}_2$ , si no que se ha detectado el incremento de otros gases de efecto invernadero como el  $\text{N}_2\text{O}$  en suelos tratados con estiércol de vaca digeridos anaeróbicamente (Juárez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Por tanto, después de evaluar en conjunto nuestros resultados, creemos que es importante elaborar un manual de buenas prácticas de uso de lodos de depuradora en agricultura que defina el tipo, la dosis y la frecuencia de aplicación de estos residuos en los suelos. Para ello, es sumamente importante establecer límites en el número de bacterias patógenas de origen fecal y humano, y resistentes a antibióticos permisibles en los lodos. Dependiendo de esas características, se podrán establecer parámetros que nos permitan decidir si el lodo es apropiado o no para el uso en suelos agrícolas, pues actualmente no existen directivas españolas que indiquen los niveles máximos permisibles o tolerables de esas bacterias en ellos. Además, como se desprende de

nuestros resultados, sería muy importante realizar un seguimiento periódico de los suelos sometidos a estos tratamientos para evaluar los posibles cambios en la microbiota de los mismos y su posible impacto sanitario.

## 2.7 CONCLUSIONES

---

- La adición de lodo incrementó la biomasa microbiana y la respiración del suelo de forma dependiente del tipo y de la concentración de lodo utilizada siendo mayor con el uso de lodo aerobio a bajas concentraciones, efecto que se tradujo en una mayor emisión de CO<sub>2</sub> con este tratamiento. El incremento de esas propiedades se relacionó con el incremento de la temperatura y con la disminución de la humedad aunque no se produjeron cambios sustanciales en los valores de biomasa y respiración a lo largo de nuestro análisis en el suelo control (*Soil*).
- Por el contrario, el número de microorganismos oligotróficos y copiotróficos se incrementó más en las parcelas tratadas con las mayores dosis de lodo aerobio y anaerobio, siendo el tratamiento de lodo aplicado el parámetro más influyente. En el suelo control (*Soil*) el número de estos microorganismos se mantuvo estable en casi todos los análisis del estudio.
- El número total de coliformes fecales, enterococos y clostridios se incrementó en las parcelas tratadas con lodo, principalmente en las de mayor dosis siendo la humedad, la temperatura, la dosis y el tipo de lodo (lodo anaerobio) aplicado los parámetros asociados con el aumento de estas bacterias en los suelos. El número de coliformes y enterococos fue disminuyendo a lo largo de los dos años de análisis, pero permaneció en las parcelas tratadas con mayor dosis. Sin embargo, los clostridios fueron detectados en todas las muestras durante todo el periodo de análisis. Se han identificado bacterias patógenas en el suelo control (*Soil*) en algunos muestreos.
- La utilización de lodos de depuradora en suelos agrícolas incrementó el número de bacterias resistentes a distintas concentraciones de ampicilina de forma directa con el incremento de la dosis, especialmente a 32 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Sin embargo, el porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina (32 y 64 µg mL<sup>-1</sup>) se incrementó solo en las parcelas con la mayor dosis de lodo aerobio, disminuyendo en las de anaerobio. Tanto las características del suelo en cada muestreo como el tratamiento de lodo utilizado influyeron significativamente en el incremento del número de bacterias resistentes a 32 y 64 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, pero no en el caso de la resistencia a 1 g L<sup>-1</sup> de ampicilina. Bacterias resistentes a distintas concentraciones de ampicilina fueron detectadas en el suelo agrícola control (*Soil*) comprobando la resistencia a antibióticos en el suelo natural.

## **CAPÍTULO III**

- 3. La adición de lodos de depuradora modifica la estructura de las poblaciones microbianas durante un largo periodo de tiempo.**



# La adición de lodos de depuradora modifica la estructura de las poblaciones microbianas durante un largo periodo de tiempo.

## 3.1 RESUMEN

---

**INTRODUCCIÓN:** El ecosistema del suelo está compuesto por una diversidad enorme de microorganismos que ejercen un papel esencial en el ciclo de los nutrientes. Esa diversidad microbiana es bastante variable debido a las condiciones bióticas y abióticas presentes. Por ello, las técnicas moleculares son la mejor manera de intentar estimar la población microbiana presente en el suelo. Así, mediante esa técnica se ha estimado que *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*) y *Verrucomicrobia* son los filos más comunes en el suelo. Las estimaciones de la comunidad bacteriana del suelo son importantes, puesto que los cambios en ésta sirven como indicador en su estructura, estabilidad y sostenibilidad. Un ejemplo que podría causar cambios en la composición microbiana del suelo es el uso de fertilizantes orgánicos como lodos de depuradora.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Hemos estudiado la microbiota presente en la superficie del suelo (0-20 cm) en parcelas con enmiendas de lodos de depuradora aerobio y anaerobio (40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup>) y en el suelo agrícola control. A través de técnicas moleculares hemos obtenido secuencias del gen 16S bacteriano de cada muestra del estudio que fueron clasificadas mediante herramientas (Blast – NCBI, ClustalW) usando diversas bases de datos (NCBI, MGRAST, RDP, Greengenes). Además, hemos llevado a cabo comparaciones entre las genotecas de cada muestra para determinar las diferencias entre cada tipo de suelo y ordenaciones para comprobar cuales variables ambientales podrían influir en su comunidad bacteriana.

**RESULTADOS:** Las poblaciones bacterianas más características en el suelo agrícola mediterráneo fueron los filos *Proteobacteria* (clases *Alpha*, *Beta* y *Gamma*), *Actinobacteria*, *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*). Las dosis bajas e intermedias de lodos de depuradora añadidas modificaron la composición bacteriana del suelo, sobre todo del filo *Firmicutes* (en los primeros muestreos), *Proteobacteria* y *Acidobacteria*, aunque dos años después, las poblaciones bacterianas de esas muestras fueron similares a las del suelo control. Además, estas dosis aumentaron la biodiversidad y riqueza de especies. En cambio, las dosis más altas de lodo modificaron significativamente la composición de las poblaciones del suelo (filos *Proteobacteria* y *Acidobacteria*) incluso 2 años después de añadir el lodo, disminuyendo la diversidad y la riqueza especialmente en la muestra tratada con la mayor dosis de lodo anaerobio (ANAE160). Algunos OTUs fueron marcadores de la alteración de la población bacteriana del suelo, principalmente aquellos correspondientes a las clases *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria\_Gp6*, *Bacilli* y *Actinobacteria*. Los parámetros más influyentes en la estructura de las poblaciones bacterianas del suelo fueron el tratamiento, la dosis de lodo aplicada, el carbonato y la humedad.

**CONCLUSIONES:** Las dosis bajas e intermedias de lodos modifican las poblaciones bacterianas del suelo de manera temporal aumentando la diversidad y riqueza de especies. En cambio, las mayores dosis (sobre todo ANAE160) disminuyeron la diversidad del suelo y las modificaciones en las poblaciones bacterianas fueron detectadas incluso 2 años después de la aplicación de los lodos. Sin embargo, la mayoría de las parcelas tratadas no compartieron especies (OTUs) similares con los lodos salvo en el primer muestreo. Los OTUs de las clases *Acidobacteria\_Gp6*, *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria* podrían ser utilizados como marcadores de la alteración de la composición bacteriana del suelo.





## 3.2 INTRODUCCIÓN

---

El ecosistema del suelo está compuesto por una diversidad enorme de microorganismos que ejercen un papel esencial en el ciclo de los nutrientes, en la formación de los ácidos húmicos, en la degradación de compuestos contaminantes y en el mantenimiento de la estabilidad de los agregados y del flujo de gases en el suelo (Voroney, 2007; Falkowski *et al.*, 2008). Diversas estimaciones indican que en tan solo un gramo de suelo pueden existir kilómetros de hifas fúngicas o cerca de  $10^9$  bacterias (Voroney, 2007), lo que se puede traducir en valores tan variables como 6300 unidades taxonómicas operacionales – OTUs (Maier *et al.*, 2009) a  $8,3 \times 10^6$  especies bacterianas (Gans *et al.*, 2005).

La composición y diversidad microbiana del suelo es bastante variable. Esa variación es resultado de las condiciones bióticas y abióticas presentes en el suelo (Buckley y Schmidt, 2001a; Fierer y Jackson, 2006). Según la literatura, diversos factores ambientales como el tipo de vegetación, la humedad, la temperatura, el pH, la cantidad de nutrientes y carbono presentes o la cantidad de materia orgánica del suelo parecen alterar la comunidad microbiana y sus actividades en el suelo (Lang y Smith, 2007). De todos estos factores ambientales, el pH del suelo parece estar más fuertemente relacionado con la composición microbiana del suelo (Fierer y Jackson, 2006; Kuramae *et al.*, 2010; Brockett *et al.*, 2011).

Muchos de los microorganismos que forman parte de la microbiota del suelo son incultivables y no crecen en los medios de cultivo habitualmente utilizados, puesto que no se adaptan a ellos ni a las condiciones de crecimiento debido a sus distintas condiciones fisiológicas (por ejemplo, microorganismos anaerobios y psicrófilos, microorganismos que crecen con la presencia o ausencia de nutrientes distintos, por ejemplo) (Torsvik *et al.*, 1998). Por ello, las técnicas independientes de cultivo como las moleculares son la mejor manera de intentar estimar la población microbiana presente en el suelo (Atlas y Bartha, 2002), siendo el análisis de las secuencias del gen 16S bacteriano uno de los métodos más frecuentemente utilizados (Tringe *et al.*, 2005; Roesch *et al.*, 2007; Elshahed *et al.*, 2008).

A través de estos estudios moleculares, se ha estimado que los filos más comúnmente encontrados en el suelo son *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta* y *Gamma*) y *Verrucomicrobia* (Janssen, 2006; Fierer *et al.*, 2007b; Castro *et al.*, 2010). Estas estimaciones de la microbiota del suelo sirven para conocer por lo menos una fracción de la que compone ese extenso ecosistema y además, para evaluar los cambios en la microbiota que se producen en distintas circunstancias, naturales o artificiales. Una de estas últimas es la utilización de residuos orgánicos como fertilizantes agrícolas en los suelos. Su uso puede producir modificaciones beneficiosas en las propiedades del suelo como el incremento de la materia orgánica, la humedad, la estabilidad de los agregados, o la biomasa y actividad microbiana por lo que su uso está muy difundido (Deboz *et al.*, 2002; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Lal, 2007; Calbrix *et al.*, 2007). Además, los fertilizantes orgánicos contribuyen al crecimiento de la población microbiana del suelo y estimulan los ciclos biogeoquímicos (Nakatani *et al.*, 2011), debido a que en su composición existe una gran cantidad de nitrógeno y fósforo (Fytli y Zabaniotou, 2008).

Estos cambios en las propiedades del suelo producen modificaciones en la estructura de la comunidad microbiana. Por ello, el análisis de su diversidad y estructura es esencial para evaluar las modificaciones del suelo y su calidad (Hartmann y Widmer, 2006). Las características de los microorganismos presentes pueden indicar cambios en la cantidad de nutrientes, en la estructura del suelo o la presencia de sustancias contaminantes (Pankhurst *et al.*, 1996; Delong y Pace, 2001). Los efectos del uso de fertilizantes orgánicos como los lodos de depuradora, por ejemplo, son variables dependiendo de su composición por lo que deben hacerse evaluaciones de los cambios en la microbiota y de los aspectos edáficos (características fisicoquímicas del suelo) del suelo (Lambais y do Carmo, 2008).

Actualmente, el uso de los lodos de depuradoras urbanas es principalmente como enmiendas en los suelo alcanzando 65 % del total producido en España y el 60 % en los Estados Unidos de América (United States Environmental Protection Agency, 1995; Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009). Los residuos de depuradora más comúnmente utilizados en los Estados Unidos son los biosólidos de clase B, que son el resultado de una digestión mesófila anaeróbica de los lodos de depuradora (Brooks *et al.*, 2007a; Pepper *et al.*, 2008). Estos residuos pueden estar compuestos por gran cantidad de sustancias contaminantes, como por ejemplo, metales pesados, xenobióticos o antibióticos (Brooks *et al.*, 2007a; Wakelin *et al.*, 2010). La contaminación del suelo por metales pesados, por ejemplo, puede producir una disminución en la diversidad genética y la alteración de la estructura de la comunidad microbiana llegando a producir un descenso del número total de especies detectadas de entre dos y tres órdenes de magnitud (Gans *et al.*, 2005).

Por esta razón, nuestro trabajo ha consistido en el estudio de los cambios que los lodos de depuradora pueden producir en la microbiota del suelo. Hemos analizado durante dos años el suelo de parcelas control y parcelas tratadas con distintos tipos (aerobio y anaerobio) y dosis de lodos de depuradora (40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup>), mediante análisis moleculares basados en la fabricación de minigenotecas del gen 16S bacteriano con el fin de describir: 1) las poblaciones bacterianas características del suelo control; 2) las poblaciones bacterianas presentes en las parcelas de suelo tratadas con distintas cantidades y tipos de lodos de depuradora; y 3) la evolución comparativa de las poblaciones en cada parcela de suelo a lo largo del estudio.

### 3.3 OBJETIVOS

---

El objetivo general de este trabajo consiste en analizar los efectos de la utilización de enmiendas de lodos de depuradora urbana sobre las poblaciones bacterianas en un suelo agrícola mediterráneo mediante el uso de técnicas de análisis molecular. Estos objetivos han sido desarrollados a través del proyecto de investigación CGL2006-13915/CLI en el que estudiamos la evolución de la microbiota de un suelo agrícola tras la adición de lodos de depuradora urbana.

Los objetivos concretos de este capítulo son los siguientes:

- Determinar y describir la composición de la microbiota bacteriana de un suelo agrícola mediterráneo que no fue sometido a ningún tratamiento (*Soil*) y de diversas parcelas del mismo suelo enmendadas con 40, 80 y 160 t ha<sup>-1</sup> de lodo aerobio y anaerobio. Así como la diversidad y riqueza de especies de cada muestra.
- Analizar qué variables ambientales influyeron en la composición bacteriana del suelo sin tratar y de los suelos tratados con distintas cantidades de lodos.
- Detectar la duración de la perturbación que produce la aplicación de los lodos de depuradora en función de la dosis utilizada.
- Detectar cuáles fueron los OTUs característicos del suelo agrícola sin tratamiento y de las parcelas tratadas con distintas cantidades y dosis de lodos.

## 3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

---

La localización de las parcelas, la distribución de los lodos, la descripción de las muestras y del muestreo se detalla en el apartado 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS (CAPITULO II).

### 3.4.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE SUELO

#### 3.4.1.1 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL

La extracción del DNA total de cada muestra de suelo se llevó a cabo mediante el protocolo descrito a continuación (Griffiths *et al.*, 2000).

- Se pesaron 500 mg del suelo en un *eppendorf* estéril.
- Se añadió al suelo, 500 µL del buffer de extracción CTAB (tampón fosfato 0,24 M (pH 8) y 10% CTAB en 0,7 M NaCl) y 500 µL del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; pH 8,0).
- Se lisó la muestra durante 30 segundos (velocidad 5) con 250 mg de bolitas de vidrio (una mezcla de los siguientes tamaños: 1,0; 0,5 y 0,1 mm) mediante el sistema de agitación *FastPrep*<sup>®</sup> (FP120 *Bead Beating System*).
- Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12000 rpm a 4°C.
- Se alicuoteó la fase acuosa en un nuevo *eppendorf* frío y estéril (~450 µL).
- Se añadió a la fase acuosa el mismo volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (~450 µL).
- Se agitó con *vórtex* la muestra para mezclar ambas fases.
- Se centrifugó la muestra a 12000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
- Se alicuoteó la fase acuosa en otro *eppendorf* estéril y frío (~400 µL).
- Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de una solución de PEG 6000 a 30% en 1,6M de NaCl (100 g de PEG 6000 en 300 mL de NaCl 1,6 M c.s.p.), se mezcló y se dejó en reposo precipitando durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se añadieron 500 µL de etanol 75% helado para lavar el precipitado.
- Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se secó el precipitado al aire durante 5 minutos.
- Se resuspendió con agua ultrapura y posteriormente, se congeló a -20°C.

### 3.4.1.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS 16S.

Con el fin de detectar los microorganismos presentes en las poblaciones del suelo sin tratar y de las parcelas tratadas con distintas cantidades de lodos de depuradora, se llevó a cabo la amplificación de la secuencia 16S utilizando la técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Sambrook *et al.*, 1989; Current protocols in molecular biology, 1993). Para ello, se utilizó el DNA extraído del suelo junto con los cebadores **E8F** (5'-AGA-GTT-TGA-TCT-GGC-TCA-G-3') y **U1510Ri** (5'-CGG-TTA-CCT-TGT-TAC-GAC-T-3') y la polimerasa *Expand*<sup>®</sup> (Roche<sup>®</sup>). Estos cebadores son clásicos y se encuentran en la zona inicial y terminal de la secuencia del rDNA 16S presente en las bacterias (Baker *et al.*, 2003).

Antes de hacer las reacciones de PCR, se midió la concentración en un espectrofotómetro *Nanodrop*<sup>®</sup> (Fisher Scientific) para que cada reacción tuviera una concentración final de 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA. Los cebadores se dispusieron a una concentración final de 0,6  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$  de desoxinucleótidos trifosforilados 1,25 mM, 1  $\mu\text{M}$  Tampón 10X (Roche<sup>®</sup>), polimerasa Taq (*Expand*<sup>®</sup>, Roche) y agua ultrapura. El programa que se utilizó para la amplificación consiste en un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 22 ciclos con una secuencia de temperaturas de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos. Se hizo un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos. La amplificación se llevó a cabo con 5 réplicas para cada muestra en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  para cada reacción en un termociclador *Minicycler* (MJ Research).

Se analizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) y se purificaron las bandas de DNA amplificadas con el *kit Geneclean*<sup>®</sup> (Qbiogene) para eliminar los cebadores utilizados y el exceso de DNA genómico de las muestras.

### 3.4.1.3 FABRICACIÓN DE MINIGENOTECAS.

A partir de los fragmentos 16S amplificados se construyeron minigenotecas en el plásmido pGEM-T<sup>®</sup> (Promega) mediante ligación durante 18 horas a 4°C en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  utilizando 100 ng de DNA amplificado y purificado.

### 3.4.1.4 TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*.

Se transformó cada minigenoteca en células de *Escherichia coli* competentes que fueron preparadas según el protocolo descrito a continuación (Sambrook y Russell, 2006).

- Se tomaron las alícuotas necesarias de células competentes de -80°C.
- Se descongelaron las alícuotas en la palma de la mano.
- En el momento en que estaban descongeladas, se introdujeron y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos.
- Se añadió el DNA de cada muestra a una alícuota de células distinta y se mezcló suavemente.

- Se mantuvieron las alícuotas en hielo durante 30 minutos.
- A continuación se incubaron las alícuotas a 42°C durante 90 segundos sin agitación.
- A continuación se mantuvieron las alícuotas en hielo durante 2 minutos.
- Se añadieron 800 µL de medio SOC a cada alícuota.
- Se incubaron a 37°C durante 15 minutos.
- Se centrifugaron las muestras durante 30 segundos a 10000 rpm.
- Se eliminaron 750 µL de sobrenadante y se resuspendieron los pellets.
- Se sembraron en medio LB XGAL-IPTG-ampicilina que se incubó a 37°C durante 18-24 horas.

#### **3.4.1.5 SIEMBRA DE LOS TRANSFORMANTES EN PLACA MULTIPOCILLO (96 POCILLOS).**

Se sembraron los transformantes correspondientes a cada muestra en una placa multipocillo (96 pocillos) con medio LB y ampicilina 100 µg mL<sup>-1</sup>, y en otra placa multipocillo con medio TB-sales y 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina (1 mL, Placa del *kit Accuprep*<sup>®</sup>, *Bioneer*) para extraer el DNA plasmídico. Se incubó la placa con medio LB a 37°C durante 18 horas de forma estática y la placa con TB se incubó a 37°C con agitación constante para que las células crecieran más rápidamente y en mayor cuantía.

#### **3.4.1.6 EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO Y SECUENCIACIÓN.**

Se extrajo el DNA plasmídico de las muestras mediante el *kit Accuprep*<sup>®</sup> (*Bioneer*) según el protocolo a continuación.

- Tras la incubación descrita en el anterior epígrafe, se centrifugó la placa multipocillo durante 20 minutos a 1000 g (2000 rpm).
- Se invirtió la placa rápidamente para eliminar todo el medio de cultivo.
- Se añadieron 200 µL del tampón de resuspensión (RS) (al que se ha añadido RNAsa) a cada pocillo para resuspender las células y eliminar el RNA presente en la muestra.
- Se montó el sistema en el aparato de vacío (*Biovac96*<sup>®</sup>) cuidadosamente para evitar contaminaciones cruzadas entre los pocillos durante el proceso de extracción. Se dispuso la placa de unión de DNA (*Binding Plate*) en el fondo del aparato. Encima de ella, la placa que sella el sistema para producir vacío y luego la placa de unión de restos celulares y proteínas (*Trapping Plate*).
- Se transfirió todo el líquido (las células que se habían resuspendido) a la placa de unión de restos celulares y proteínas (*Trapping Plate*) montada en el sistema.

- Se añadieron 200  $\mu$ L de tampón de lisis (BL) a cada pocillo para inducir la lisis de las células. Se selló la placa con una de las láminas transparentes suministradas. Se mezcló invirtiendo el bloque completo 8 veces y se dejó la placa en reposo durante 5 minutos.
- Se despegó la lámina transparente con mucho cuidado secando los bordes entre pocillos para evitar la contaminación de unos con otros.
- Se añadieron 200  $\mu$ L de tampón de desnaturalización (RB) a cada pocillo para precipitar proteínas y el DNA genómico. Se selló la placa con una de las láminas transparentes suministradas. Se mezcló invirtiendo el bloque completo 8 veces. Se dejó la placa en reposo durante 5 minutos.
- Se despegó la lámina con mucho cuidado secando los bordes entre pocillos.
- Se conectó el aparato a una bomba de vacío (potencia aplicada: 60 – 150 mm Hg) y se filtró todo el contenido que había en los pocillos. El filtrado se transfirió a la placa de unión de DNA (*Binding Plate*).
- Se desmontó el sistema y se descartó la placa de unión de restos celulares y proteínas (*Trapping Plate*).
- Se colocó la bandeja de recolección de residuos en el fondo del aparato. A continuación, se dispuso la tapa que lleva el borde que sella el sistema para producir vacío y encima de ella la placa de unión de DNA (*Binding Plate*) del anterior paso.
- A continuación, se añadió 1 mL del tampón de lavado (WB) a cada pocillo de la placa de unión de DNA (*Binding Plate*) y se filtró con vacío, repitiéndose el lavado.
- Se desmontó el aparato y se eliminó la solución que había en la bandeja de recolección de residuos.
- Se volvió a montar el aparato y se secaron los pocillos de la placa de unión de DNA (*Binding Plate*) mediante vacío (300 mm Hg o entre 200 y 600 mm Hg) para eliminar todo el etanol de las muestras de DNA.
- Se desmontó el aparato y se retiró la bandeja de recolección de residuos.
- Se colocó en el fondo del aparato la placa multipocillo suministrada, y a continuación, la tapa que lleva el borde que sella el sistema para producir vacío y, finalmente, la placa de unión de DNA (*Binding Plate*) encima de ella.
- Se añadieron en el centro de cada uno de los pocillos 100  $\mu$ L del tampón de elución (EL). Se mantuvo la placa en reposo durante 5-10 minutos.
- Se aplicó vacío a la placa hasta que se comprobó que había pasado todo el líquido de elución a través de todos los pocillos.
- Se congeló la placa multipocillo con el DNA plasmídico a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Al final de la extracción del DNA plasmídico, se enviaron alícuotas correspondientes a los 96 pocillos de cada muestra para su secuenciación utilizando el cebador *E8F* en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-Universidad Politécnica de Valencia).



### 3.4.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA.

Las secuencias de DNA obtenidas fueron depuradas manualmente analizando los cromatogramas mediante el programa *Chromas 2.31* (Technelysium Pty Ltd). Las secuencias correspondientes a vectores fueron eliminadas utilizando el programa *VecScreen* del NCBI.

La detección de secuencias quiméricas fue llevada a cabo utilizando los programas *Chimera Detection* (Maidak *et al.*, 1999), *Pintail* (Ashelford *et al.*, 2005), *Bellerophon* versión 3 (Huber *et al.*, 2004) y la versión 3 de *Bellerophon de Greengenes* (DeSantis *et al.*, 2006) y, en algunos casos, comprobadas mediante *Ccode* (Gonzalez *et al.*, 2005), con el objetivo de eliminar esas secuencias. Tras estos análisis, las secuencias fueron nuevamente chequeadas de forma individual utilizando los programas BLAST (NCBI), *ClustalW* v1.83 (utilizando la base de datos de DNA japonesa, DDBJ) y MGRAST (Base de datos de *Greengenes* y RDP al 90%). Finalmente, si existía alguna discrepancia entre los distintos resultados proporcionados por los programas de análisis de quimeras, se reanalizaba mediante BLAST y cuando se detectaban más de dos secuencias depositadas por distintos grupos de investigación cuya identidad excedía del 95 % con la comparada, se optó por no considerar a la secuencia en cuestión como una quimera.

Las secuencias ya depuradas (sin vectores ni quimeras) fueron alineadas utilizando la herramienta *Align* del programa *Greengenes* (DeSantis, Jr. *et al.*, 2006) adoptando un 80% de identidad y un tamaño mínimo de 200 pares de base. Posteriormente, fueron clasificadas con un 80% de identidad, utilizando el programa *Classifier* (Wang *et al.*, 2007) de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP 10) (Cole *et al.*, 2009) para asignar el grupo bacteriano a cada una de ellas. La asignación de un OTU (*Operational Taxonomic Unit*) a cada secuencia de DNA de nuestras genotecas se llevó a cabo mediante el programa *Classify* de *Greengenes* (DeSantis *et al.*, 2006) utilizando un archivo con todas las secuencias de DNA alineadas mediante *ClustalW* y la taxonomía de RDP.

Con el fin de determinar si existían diferencias estadísticas entre las distintas genotecas 16S generadas, se hicieron comparaciones utilizando el programa *Libcompare* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP 10) (Cole *et al.*, 2009). Para comparar los OTUs generados con el programa *Classify* de la base de datos *Greengenes*, se utilizó la aplicación *MeV* del conjunto de programas TM4 ajustando los datos mediante normalización por muestra y realizando un agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) utilizando la optimización del orden de las muestras y el cálculo de las distancias a través de la correlación de Pearson (*average linkage clustering*) (Saeed *et al.*, 2003).

Las direcciones de internet de todos estos programas se encuentran en la Tabla 21.

### 3.4.3 ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE LAS MUESTRAS.

Se calcularon los índices de biodiversidad y riqueza (*Shannon*, *Chao1*, *Margalef* y recíproco de *Simpson*), y las curvas de rarefacción en cada muestra por

cada muestreo del estudio mediante el programa *EstimateS* (Colwell RK. 2005. *EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples*. Versión 7.5.) y *Rarefaction Calculator* (Simberloff, 1978), respectivamente. Se utilizaron los índices de *Margalef*, *Shannon*, el recíproco de *Simpson*, *Chao1*, *Alfa* y *Evenness* para medir la riqueza y diversidad de las muestras. Las fórmulas de todos estos índices se muestran en la Tabla 20.

ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD	FÓRMULAS
<i>Margalef</i>	$\frac{S-1}{\ln(N)}$
<i>Shannon</i> (H)	$\Sigma[(\frac{n}{N})\ln(\frac{n}{N})]$
Recíproco de <i>Simpson</i>	$D = \frac{1}{\Sigma n(n-1)}$
<i>Chao1</i>	$S + \frac{n_1^2}{2n_2}$
<i>Alfa</i> ( $\alpha$ )	$\frac{N(1-x)}{x}$
<i>Evenness</i> (E)	$\frac{H}{\log(S)}$

**Tabla 20. Índices de biodiversidad y sus respectivas fórmulas.** Los índices de *Shannon* (H), recíproco de *Simpson*, *Chao1* y *Alfa* ( $\alpha$ ) fueron calculados con el programa *EstimateS* (Colwell RK. 2005. *EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples*. Versión 7.5.), mientras que *Margalef* y *Evenness* fueron calculados con el programa *Excel* 2007 (Microsoft Corporation). Las variables de las fórmulas y sus respectivos significados fueron: S = N° de OTUs; N = N° total de clones en cada muestra; D = Índice de Simpson;  $n_1$  = N° de clones que aparecen una sola vez (*singletons*);  $n_2$  = N° de clones que aparecen dos veces (*doubletons*); la variable x es obtenida de la fórmula  $S/N = [(1-x/x)][-\ln(1-x)]$ .

PROGRAMAS UTILIZADOS	DIRECCIÓN
<i>VecScreen</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html</a>
<i>Bellerophon</i> versión 3	<a href="http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl">http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl</a>
<i>Bellerophon</i> (Greengenes)	<a href="http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi">http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi</a>
<i>Ccode</i>	<a href="http://www.irnase.csic.es/users/micro/software/ccode.html">http://www.irnase.csic.es/users/micro/software/ccode.html</a>
<i>ClustalW</i> v1.83 (DDBJ)	<a href="http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html">http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html</a>
<i>MGRAST</i>	<a href="http://metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Home">http://metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Home</a>
<i>Greengenes</i>	<a href="http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi">http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi</a>
<i>Classifier</i>	<a href="http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp">http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp</a>
<i>Classify</i> (Greengenes)	<a href="http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-classify.cgi">http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-classify.cgi</a>
<i>Libcompare</i> (RDP10)	<a href="http://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp">http://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp</a>
<i>MeV</i> (TM4)	<a href="http://www.tm4.org/mev/">http://www.tm4.org/mev/</a>
<i>EstimateS</i>	<a href="http://purl.oclc.org/estimates">http://purl.oclc.org/estimates</a>
<i>Rarefaction calculator</i>	<a href="http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php">http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php</a>

**Tabla 21. Direcciones de las páginas en internet de los programas utilizados para el análisis de secuencias.**

#### 3.4.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los porcentajes de las poblaciones bacterianas de cada muestra fueron procesados usando Excel 2007 (Microsoft Corporation).

Los diagramas de ordenación mediante análisis de redundancia (RDA) y los análisis de componentes principales (PCA) fueron llevados a cabo mediante el programa *Canoco for Windows* v4.5 (*Biometris, Plant Research International*) utilizando el test de permutación de Monte Carlo bajo el modelo reducido (999 permutaciones). En general, para la representación gráfica se seleccionaron aquellas propiedades significativas ( $p < 0,05$ ) que describieron la distribución.

## 3.5 RESULTADOS

---

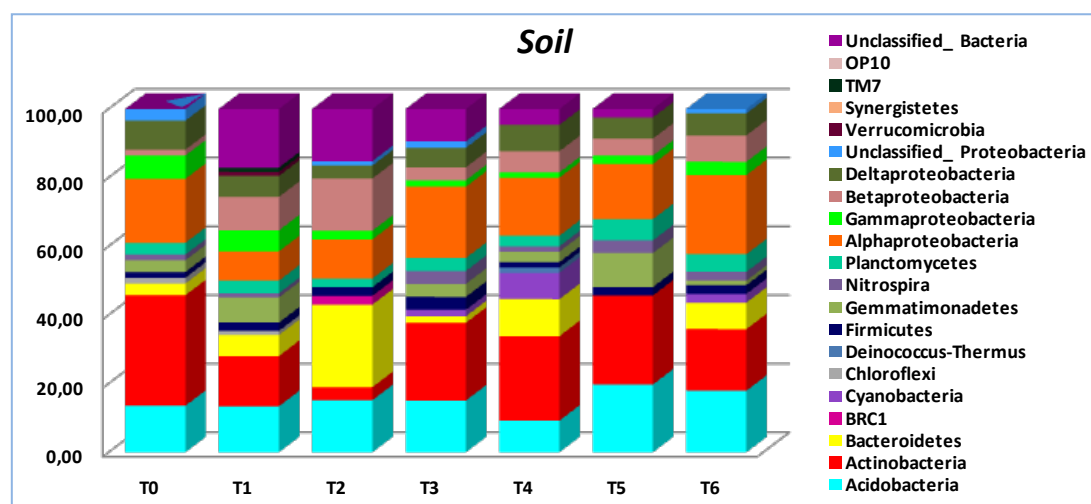
Con el fin de llevar a cabo los análisis moleculares extrajimos el DNA total de cada muestra de suelo tomada en las respectivas fechas de muestreo. Hemos ensayado algunos métodos para extraer el DNA total siendo uno de ellos un método específico para el suelo (*PowerSoil*, MoBio) y otras técnicas que utilizan lisis celular química (Fortin *et al.*, 1998) o mediante procesos físicos como microondas (Orsini y Romano-Spica, 2001) con diversas modificaciones. Sin embargo, la cantidad y la calidad del DNA extraído fueron muy variables y la amplificación posterior por PCR no fue reproducible. Finalmente, seleccionamos el método de extracción de DNA descrito por Griffiths y cols. por su reproducibilidad, eficacia y rendimiento (Griffiths *et al.*, 2000). Posteriormente, purificamos el DNA utilizando un *kit* comercial (*GeneClean*, MP Biomedicals) y amplificamos la secuencia del gen 16S mediante PCR utilizando los cebadores específicos (*E8F* y *U1510*) de regiones conservadas del DNA que codifica dicha región (Baker *et al.*, 2003). Los productos de PCR fueron clonados en un vector comercial (pGEM-T® Promega) para fabricar minigenotecas que fueron enviadas para ser secuenciadas utilizando el mismo cebador *E8F*. Las secuencias obtenidas fueron depuradas y posteriormente analizadas y clasificadas utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP 10) (Cole *et al.*, 2005). Además, hemos utilizado el programa *Greengenes* para determinar los OTUs de cada muestra.

### 3.5.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA COMPOSICIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS CARACTERÍSTICAS EN UN SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO.

#### 3.5.1.1 COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LAS MUESTRAS DE SUELO CONTROL.

En el suelo sin tratar (*Soil*) las poblaciones bacterianas más abundantes y más comúnmente encontradas correspondían a los filos *Proteobacteria* (clases *Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*, género *Agromyces*), *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, género *Flavisolibacter*) (Figura 33). De entre estos filos, la población más frecuente correspondió al filo *Proteobacteria* y las clases de ese filo más abundantes fueron *Alphaproteobacteria* (género *Sphingomonas*), seguida de *Betaproteobacteria* (género *Methylibium*), *Deltaproteobacteria* (orden *Myxococcales*) y *Gammaproteobacteria* (género *Steroidobacter*) (Figura 33). Estas poblaciones bacterianas características se mantuvieron relativamente constantes en casi todos los muestreos a excepción del de febrero de 2008 (T2) en el que hemos observado una notable disminución del filo *Actinobacteria* y un aumento considerable de *Bacteroidetes*, y las mayores proporciones de las clases *Betaproteobacteria* en T1 y en T2, y de *Gammaproteobacteria* en T0 y en T1, además de la menor proporción de *Acidobacteria* en T4 (Figura 33). Algunos filos bacterianos como *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Gemmatimonadetes*, *OP10*, *Planctomycetes*, *Synergistetes*,

TM7, *Verrucomicrobia* correspondieron a una pequeña proporción del total o en algunos muestreos del estudio (Figura 33).



Filos – Soil	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>Acidobacteria</b>	13,56	13,41	15,19	15,09	9,23	19,75	17,95
<b>Actinobacteria</b>	32,20	14,63	3,80	22,64	24,62	25,93	17,95
<b>Bacteroidetes</b>	3,39	6,10	24,05	1,89	10,77	0,00	7,69
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	2,53	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	1,89	7,69	0,00	2,56
<b>Chloroflexi</b>	1,69	1,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	1,69	2,44	2,53	3,77	1,54	2,47	2,56
<b>Gemmatimonadetes</b>	3,39	7,32	0,00	3,77	3,08	9,88	1,28
<b>Nitrospira</b>	1,69	1,22	0,00	3,77	1,54	3,70	2,56
<b>Planctomycetes</b>	3,39	3,66	2,53	3,77	3,08	6,17	5,13
<b>Proteobacteria</b>	38,98	30,49	34,18	33,96	32,31	29,63	42,31
<b>Alphaproteobacteria</b>	18,64	8,54	11,39	20,75	16,92	16,05	23,08
<b>Gammaproteobacteria</b>	6,78	6,10	2,53	1,89	1,54	2,47	3,85
<b>Betaproteobacteria</b>	1,69	9,76	15,19	3,77	6,15	4,94	7,69
<b>Deltaproteobacteria</b>	8,47	6,10	3,80	5,66	7,69	6,17	6,41
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	3,39	0,00	1,27	1,89	0,00	0,00	1,28
<b>Verrucomicrobia</b>	0,00	1,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	1,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	0,00	17,07	15,19	9,43	4,62	2,47	0,00

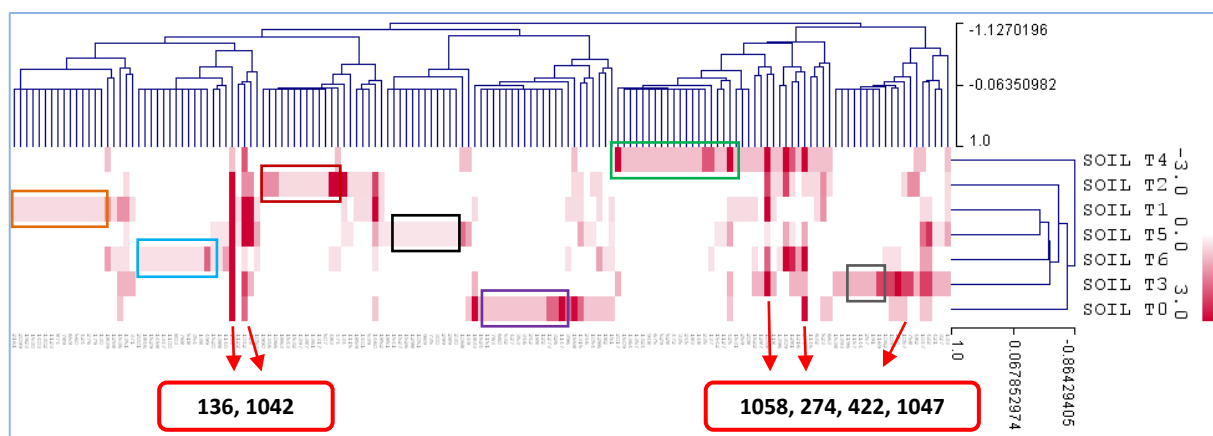
**Figura 33. Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela control - Soil.** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud con la base de datos (Cole *et al.*, 2007).

### 3.5.1.2 VARIACIONES DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA EN EL SUELO CONTROL A LO LARGO DE DOS AÑOS DE ANÁLISIS.

Con el fin de detectar si existen variaciones en las proporciones de las poblaciones bacterianas del suelo control a lo largo de los análisis, hemos realizado comparaciones de la composición de las genotecas generadas con el programa *Libcompare* de *RDP10* (Cole *et al.*, 2009) y el algoritmo de clasificación de *Greengenes* cuyos resultados hemos representado mediante la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4* (descrito en Materiales y Métodos). Hemos observado que aunque *Greengenes* utilice la base de datos del RDP, genera resultados ligeramente distintos a los obtenidos con el *Libcompare* en el mismo RDP. Un ejemplo claro de esa diferencia es la asignación en *Greengenes* de varias secuencias al OTU 117, que corresponde a una bacteria sin clasificar, puesto que no encuentra similitud con ningún otro OTU. Sin embargo, utilizando la misma base de datos de RDP, *Libcompare* clasifica a algunas de esas mismas secuencias dentro un filo bacteriano específico (por ejemplo, *Acidobacteria*). Por esta razón, hemos eliminado el OTU 117 de los análisis de comparación realizados con la aplicación *MeV* (Figura 34).

En la comparación entre OTUs realizada con *Greengenes*, hemos detectado que a pesar de que existan diferencias entre cada uno de los muestreos, algunos OTUs están presentes en casi todas las muestras en la mayoría de los análisis, de entre ellos los principales pertenecieron a los filos *Acidobacteria* (136), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1058), *Actinobacteria* (274 y 422) y *Nitrospira* (1047) (Figura 34).

Las diferencias entre el primer muestreo (T0) y el resto se manifiestan principalmente en la proporción de los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (clases *Alpha* y *Betaproteobacteria*) (Tabla 22). No hemos detectado diferencias en las proporciones del filo *Firmicutes* y de la clase *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*). Entre junio de 2007 (T0) y los siguientes muestreos (T1 a T6), hemos observado una menor proporción del filo *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*) en T1, T2 y T6, de la clase *Alphaproteobacteria* (clase *Rhizobiales*, género *Rhizobium*, familia *Rhizobiaceae*) en T1 a T6, siendo esa menor proporción en T3 del orden *Rhodobacterales*, familia *Rhodobacteraceae* (clase *Alphaproteobacteria*) (Tabla 22). Además, hemos detectado una mayor proporción del filo *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, orden *Sphingobacteriales*, familia *Chitinophagaceae*, género *Flavisolibacter*) en T2 respecto a T0 (Tabla 22). Estas diferencias encontradas en *Libcompare* son similares a las detectadas en el análisis llevado a cabo con *Greengenes*, que tiene en cuenta los OTUs presentes en cada muestreo (Figura 34), puesto que las principales diferencias existentes entre el suelo control en T0 se manifiestan, en su mayoría, en el grupo de OTUs perteneciente a los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (sobre todo la clase *Alphaproteobacteria*), como se puede apreciar en el rectángulo violeta en la Figura 34.



T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1147 Alphaprot.	130 Acidob.	483 Bactero.	1169 Alphaprot.	235 Actino.	230 Actino.	499 Bactero.
326 Actino.	179 Actino.	507 Bactero.	191 Actino.	148 Actino.	289 Actino.	138 Acidob.
1273 Alphaprot.	276 Actino.	1317 Betaprot.	257 Actino.	183 Actino.	299 Actino.	354 Actino.
122 Acidob.	424 Actino.	1361 Betaprot.	1144 Alphaprot.	245 Actino.	300 Actino.	518 Bactero.
188 Actino.	560 Bactero.	1387 Betaprot.	1157 Alphaprot.	335 Actino.	735 Firmicutes	768 Firmicutes
242 Actino.	659 Chloroflexi	1397 Betaprot.	1196 Alphaprot.	472 Bactero.	969 Firmicutes	803 Firmicutes
346 Actino.	789 Firmicutes	1532 Deltaprot.	1393 Betaprot.	528 Bactero.	1051 Planctom.	1100 Alphaprot.
353 Actino.	874 Firmicutes	1543 Deltaprot.	1538 Deltaprot.	529 Bactero.	1298 Alphaprot.	1347 Betaprot.
427 Actino.	1123 Alphaprot.	1066 Alphaprot.		675 Deinoc-Therm.	1526 Deltaprot.	1458 Betaprot.
532 Bactero.	1302 Alphaprot.	1346 Betaprot.		948 Firmicutes	1527 Deltaprot.	1529 Deltaprot.
660 Chloroflexi	1403 Betaprot.	1990 BRC1		1324 Betaprot.	1541 Deltaprot.	1846 Gammaprot.
763 Firmicutes	1530 Deltaprot.			1357 Betaprot.	1851 Gammaprot.	2001 Cyanobac.
1151 Alphaprot.	1923 Verrucomic.			1364 Betaprot.		
1524 Deltaprot.	2099 Alphaprot.			1509 Deltaprot.		
	2161 TM7			2017 Cyanobac.		

**Figura 34. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra de suelo control en los distintos muestreos.** Se llevó a cabo con la aplicación MeV del conjunto de programas TM4. Los datos han sido normalizados dentro de cada muestra y posteriormente se ha realizado una comparación mediante agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) utilizando el algoritmo de *Pearson* y creando un árbol centrado en las muestras. El color rojo indica la presencia de un OTU en la muestra y cuanto más intenso es ese color, mayor es la frecuencia de un determinado OTU. Los rectángulos de distintos colores muestran las principales diferencias en cada muestra en OTUs que están descritos en la tabla abajo, y el orden de los OTUs en el listado se corresponde con la disposición de éstos en la figura de derecha a izquierda. Las flechas rojas indican aquellos OTUs más frecuentes en las muestras. Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes*.

**Tabla 22. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes del suelo control en junio de 2007 (T0) y el resto de los muestreos. Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*.**



En la comparación entre el siguiente muestreo (octubre de 2007 – T1) y el resto de los análisis, hemos observado que las principales diferencias se manifiestan en la composición del filo *Actinobacteria*, puesto que existe una menor proporción de ese grupo en T2 (clase *Actinobacteria*) que se incrementa en T4 (orden *Actinomycetales*, género *Arthrobacter*), T5 (clase *Actinobacteria*) y T6 (familia *Micrococcaceae*, género *Arthrobacter*) (Tabla 23). Además, hemos detectado una mayor proporción de *Bacteroidetes* en T2 (clase *Sphingobacteria*, orden *Sphingobacteriales*, familia *Chitinophagaceae*, género *Flavisolibacter*) y de *Alphaproteobacteria* (orden *Rhodobacterales*, orden *Rhodobacteraceae*) en T3 y T6 (Tabla 23). Esas diferencias son similares a las detectadas por *Greengenes*, puesto que algunos OTUs pertenecientes al filo *Actinobacteria* que se encuentran presentes en T5 (en negro) no son similares a los encontrados en T1, mientras que en este muestreo existen algunos OTUs característicos (*Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Firmicutes*) (en naranja) (Figura 34).

En las comparaciones entre el muestreo de febrero de 2008 (T2) y el resto, hemos observado una mayor proporción de secuencias del filo *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, familia *Micrococcaceae* y género *Arthrobacter*) y una menor proporción de *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, orden *Sphingobacteriales*, familia *Chitinophagaceae*, género *Flavisolibacter*) en los siguientes muestreos (T3 a T6) (Tabla 24). Además, hemos detectado una mayor proporción de la clase *Alphaproteobacteria* en T3 (orden *Rhodobacterales*, familia *Rhodobacteraceae*) y T6 (orden *Rhodospirillales*), y una menor proporción de la clase *Betaproteobacteria* (orden *Burkholderiales*) en T3 y T5 (Tabla 24). Esas diferencias se aprecian también en el análisis de los datos proporcionados por *Greengenes*, puesto que existen algunos OTUs en T2 que no están presentes en casi ninguna de las otras muestras, como se puede observar en el rectángulo rojo en la Figura 34. De entre ellos, los principales pertenecen a la clase *Betaproteobacteria* que presenta la mayor proporción en T2 (Figura 34).

**Tabla 23. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes del suelo control en octubre de 2007 (T1) y el resto de los muestreos. Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*.**

**Tabla 24. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes del suelo control en febrero de 2008 (T2) y el resto de los muestreos. Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*.**

En junio de 2008 (T3), las diferencias con los otros muestreos se concentran en el filo *Acidobacteria* y la clase *Alphaproteobacteria*. De entre ellas, hemos detectado una menor proporción de secuencias del filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) en T4, y de la clase *Alphaproteobacteria* (orden *Rhodobacterales*, familia *Rhodobacteraceae*) en T5 (Tabla 25), como lo observado en la Figura 33. En octubre de 2008 (T4), las principales diferencias se manifiestan en la mayor proporción de secuencias del filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) en T5 y T6, y una menor proporción del filo *Bacteroidetes* en T5 (clase *Sphingobacteria*, orden *Sphingobacteriales*) (Tabla 26). Hemos detectado además, una menor proporción del filo *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, orden *Sphingobacteriales*, familia *Chitinophagaceae*) y de la clase *Alphaproteobacteria* (orden *Rhodobacterales*, familia *Rhodobacteraceae*, género *Skermanella*) en T5 respecto a T6 (Tabla 27).

En la población bacteriana del suelo en junio de 2008 (T3) existe una pequeña cantidad de OTUs específicos que pertenecen principalmente a la clase *Alphaproteobacteria* y al filo *Actinobacteria* (en gris, Figura 34). Existen también diferencias entre T4 y los análisis restantes puesto que existen algunos grupos que no se encuentran en ninguna de las otras muestras (en verde, Figura 34) que pertenecen a la clase *Betaproteobacteria* y a los filos *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Figura 34). Además, hemos observado que el suelo control en octubre de 2008 (T4) se trata de la muestra más diferente del resto de los análisis (Figura 34). En junio de 2009 (T6) también hemos detectado algunas diferencias, sobre todo de los filos *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (principalmente las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*) (en azul, Figura 34), mientras que en T5 las diferencias se manifiestan en los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (principalmente la clase *Deltaproteobacteria*) (en negro, Figura 34).

En el caso de las comparaciones entre las secuencias de aquellos filos bacterianos que correspondieron a una pequeña proporción del total en el suelo control (filos raros) en Libcompare (Tabla 28), hemos detectado que las principales diferencias se manifiestan en el filo *Cyanobacteria* (clase *Cyanobacteria*) y *Gemmatimonadetes* (clase *Gemmatimonadetes*, género *Gemmatimonas*). Hemos detectado una mayor proporción del filo *Cyanobacteria* en el suelo control en el muestreo de octubre de 2008 (T4) comparado con los análisis en T0, T1, T2 y T5 (Tabla 28), mientras que en octubre de 2007 y febrero de 2009 (T1 y T5) existe una mayor proporción del filo *Gemmatimonadetes* comparado con los análisis de T2 y T6 (Tabla 28). Las diferencias en la proporción del filo *Cyanobacteria* entre T4 y los restantes análisis se pueden observar también en el incremento de expresión del OTU 1017 en T4 que no está presente en los otros muestreos (en negro, Figura 34). La diferencia en la proporción del filo *Gemmatimonadetes* se refleja en la mayor proporción del OTU 1042 (flecha roja, Figura 34) sobre todo en T1 y en T5.

FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	T3-T4	T3-T5
<b>Acidobacteria</b>						
	<b>Acidobacteria - Gp6</b>				6-1*	
				<b>Gp6</b>	6-1*	
<b>Proteobacteria</b>						
	<b><math>\alpha</math>-proteobacteria</b>					
		<b>Rhodobacterales</b>				4-0**
			<b>Rhodobacteraceae</b>			4-0**

**Tabla 25. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes del suelo control en junio de 2008 (T3) y el resto de los muestreos.** Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP 10*. No hay diferencias entre los muestreos de junio de 2008 (T3) y junio de 2009 (T6). Se han eliminado los grupos en los que no se han detectado diferencias.

FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	T4-T5	T4-T6
<b>Acidobacteria</b>						
	<b>Acidobacteria - Gp6</b>				1-13**	1-11**
				<b>Gp6</b>	1-13**	1-11**
<b>Bacteroidetes</b>					7-0**	
	<b>Sphingobacteria</b>				5-0**	
		<b>Sphingobacteriales</b>			5-0**	
			<b>Chitinophagaceae</b>			
				<b>Flavisolibacter</b>		

**Tabla 26. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes del suelo control en octubre de 2008 (T4) y el resto de los muestreos.** Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP 10*. Se han eliminado los grupos en los que no se han detectado diferencias.

FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	T5-T6
<b>Bacteroidetes</b>					0-6**
	<b>Sphingobacteria</b>				0-6**
		<b>Sphingobacteriales</b>			0-6**
			<b>Chitinophagaceae</b>		0-4*
				<b>Flavisolibacter</b>	
<b>Proteobacteria</b>					
	<b><math>\alpha</math>-proteobacteria</b>				
		<b>Rhodospirillales</b>			1-7*
			<b>Rhodospirillaceae</b>		1-6*
				<b>Skermanella</b>	0-4*

**Tabla 27. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes del suelo control en febrero de 2009 (T5) y junio de 2009 (T6).** Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP 10*. Se han eliminado los grupos en los que no se han detectado diferencias.

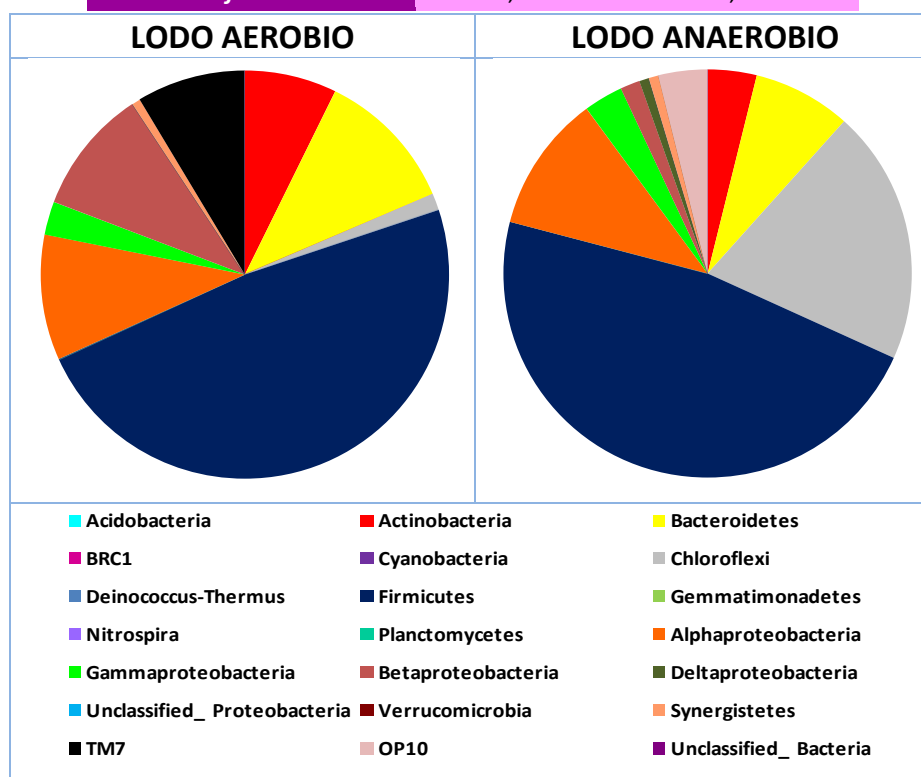
FILO	CLASE	GÉNERO	T0-T4	T1-T2	T1-T4	T2-T4	T2-T5	T4-T5	T5-T6
Cyanobacteria			0-5*		0-5**	0-5**		5-0**	
	Cyanobacteria		0-5*		0-5**	0-5**		5-0**	
Gemmatimonadetes				6-0**			0-7**		7-1*
	Gemmatimonadetes			6-0**			0-7**		7-1*
		Gemmatimonas		6-0**			0-7**		7-1*

**Tabla 28. Diferencias entre las poblaciones microbianas características en el suelo control en T5 comparada con el resto de los muestreos.** Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*. Se han eliminado los grupos en los que no se han detectado diferencias.

### 3.5.2 ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS PRESENTES EN LOS LODOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO.

En cuanto a la composición bacteriana de los lodos de depuradora utilizados como enmiendas en los suelos del estudio, hemos observado que los filos bacterianos más abundantes en el aerobio fueron *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Vagococcus*, *Trichococcus*; clase *Clostridia*, género *Clostridium*) (el de mayor proporción), *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*, género *Luteococcus*), *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*), *Proteobacteria* (clase *Alphaproteobacteria* – género *Methylocystis*, y clase *Betaproteobacteria* – orden *Burkholderiales*) y *TM7* (*TM7 genera incertae sedis*). En el caso del lodo anaerobio los filos bacterianos predominantes fueron *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Vagococcus*), *Chloroflexi* (clase *Anaerolineae*), *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*), *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*), *Proteobacteria* (clase *Alphaproteobacteria* - género *Rhodobacter*, y clase *Gammaproteobacteria* – género *Citrobacter*, fueron las clases más abundantes) y *OP10* (*OP10 genera incertae sedis*) (Figura 35). En resumen, el filo más frecuente fue *Firmicutes* (todos los géneros más abundantes correspondían a la clase *Bacilli*) en los dos lodos, seguido de *Chloroflexi* (clase *Anaerolineae*) en el lodo anaerobio (Figura 35).

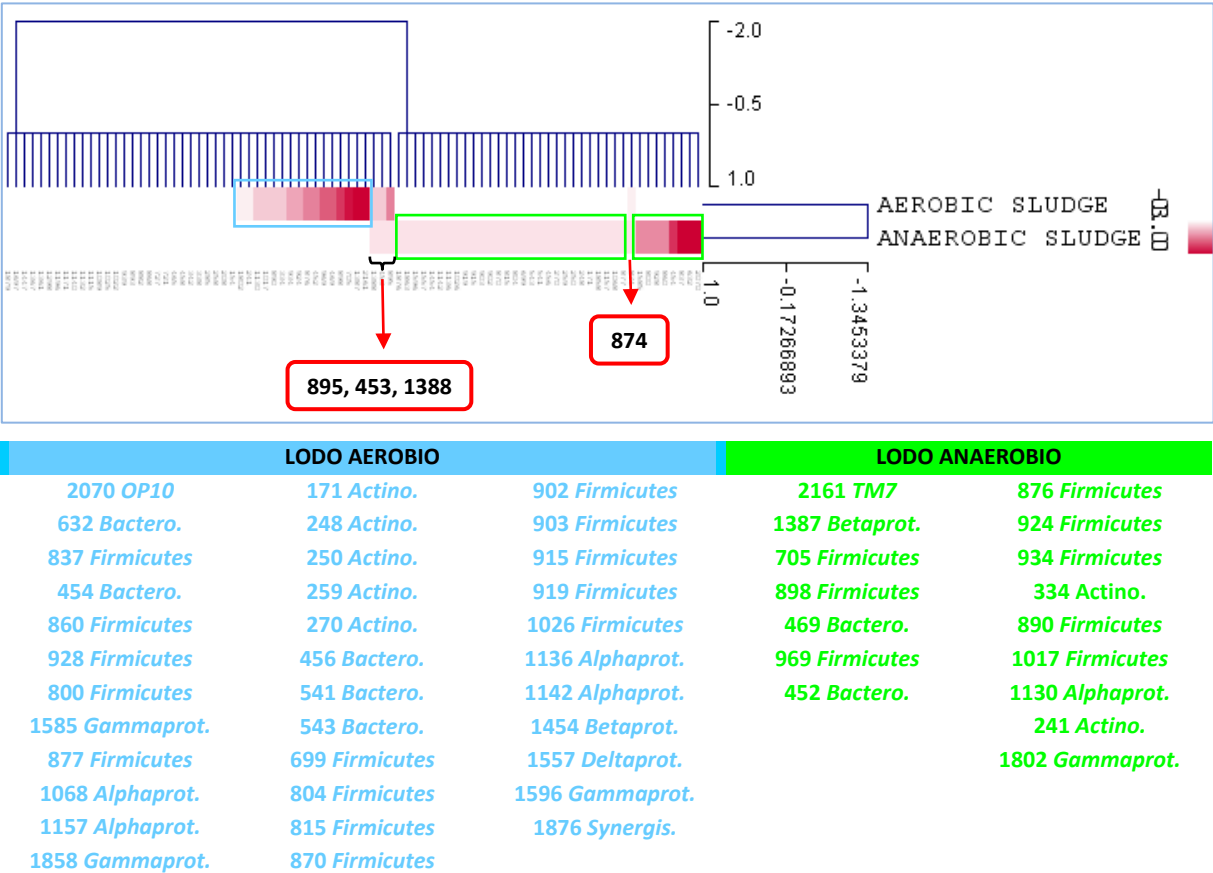
Filos	LODO AEROBIO	LODO ANAEROBIO
<i>Acidobacteria</i>	0,00	0,00
<i>Actinobacteria</i>	7,28	3,88
<i>Bacteroidetes</i>	11,26	7,75
<i>BRC1</i>	0,00	0,00
<i>Cyanobacteria</i>	0,00	0,00
<i>Chloroflexi</i>	1,32	20,16
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,00	0,00
<i>Firmicutes</i>	48,34	47,29
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,00	0,00
<i>Nitrospira</i>	0,00	0,00
<i>Planctomycetes</i>	0,00	0,00
<i>Proteobacteria</i>	22,52	16,28
<i>Alphaproteobacteria</i>	9,93	10,85
<i>Gammaproteobacteria</i>	2,65	3,10
<i>Betaproteobacteria</i>	9,93	1,55
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,00	0,78
<i>Unclassified Proteobacteria</i>	0,00	0,00
<i>Verrucomicrobia</i>	0,00	0,00
<i>Synergistetes</i>	0,66	0,78
<i>TM7</i>	8,61	0,00
<i>OP10</i>	0,00	3,88
<i>Unclassified Bacteria</i>	0,00	0,00



**Figura 35. Composición de la comunidad bacteriana presente en los lodos de depuradora aerobio y anaerobio. Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa Classifier de la base de datos Ribosomal Database Project v10 (RDP10) al 80 % de similitud (Cole et al., 2007).**

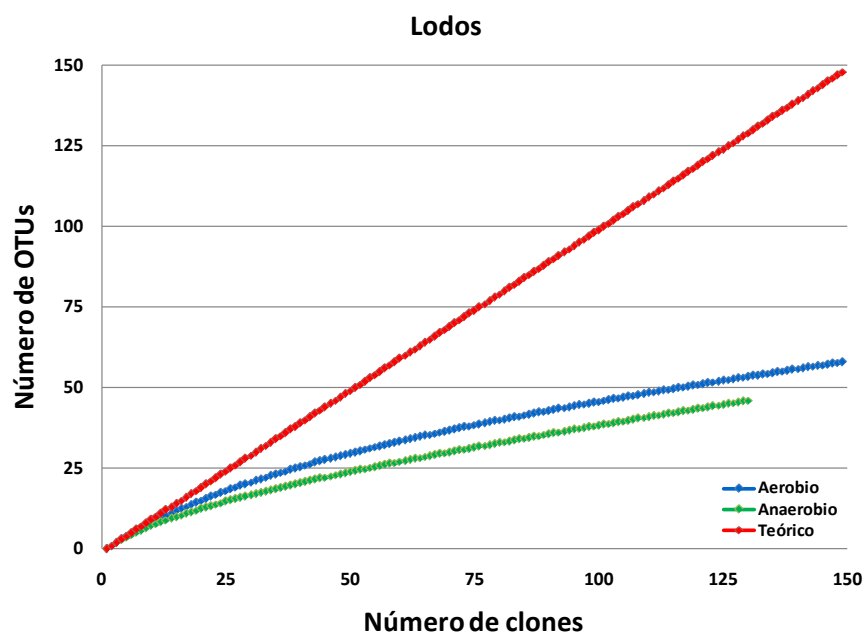
Aunque las proporciones de las poblaciones bacterianas de los lodos aerobio y anaerobio sean relativamente similares con algunas diferencias puntuales (Figura 35), la comparación entre los OTUs presentes en estos residuos muestra que los lodos presentan una composición bacteriana totalmente distinta (Figura 36). Los lodos comparten solamente algunos OTUs que indicamos en la Figura 36 en los cuadros rojos. Estos OTUs pertenecen a los filos Firmicutes, Bacteroidetes y a la clase *Betaproteobacteria*. En el lodo aerobio los OTUs más frecuentes pertenecen a los filos Firmicutes (el más abundante), Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria (*Alpha*, *Gamma* y *Betaproteobacteria*) (rectángulo azul, Figura 36). En el lodo anaerobio los OTUs más comunes pertenecen principalmente a los filos Firmicutes, TM7 y la clase *Betaproteobacteria* (rectángulos verdes, Figura 36).

En las curvas de rarefacción de los lodos utilizados en nuestro estudio, hemos detectado que el esfuerzo de muestreo fue más eficiente en el lodo aerobio que en el anaerobio (Figura 37). Sin embargo, fue posible muestrear gran parte de la diversidad microbiana de los dos lodos, puesto que las curvas tienden a ser asintóticas, con la pendiente casi igual a cero (Figura 37).



**Figura 36. Comparaciones entre los OTUs presentes en lodo aerobio y anaerobio.** Se llevó a cabo con la aplicación MeV del conjunto de programas TM4. Las especificaciones se describen en la Figura 34.





**Figura 37. Curvas de rarefacción de los lodos aerobio y anaerobio.** Se llevó a cabo con el programa *Rarefaction Calculator*.

### 3.5.3 EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS EN EL SUELO A LO LARGO DEL ENSAYO.

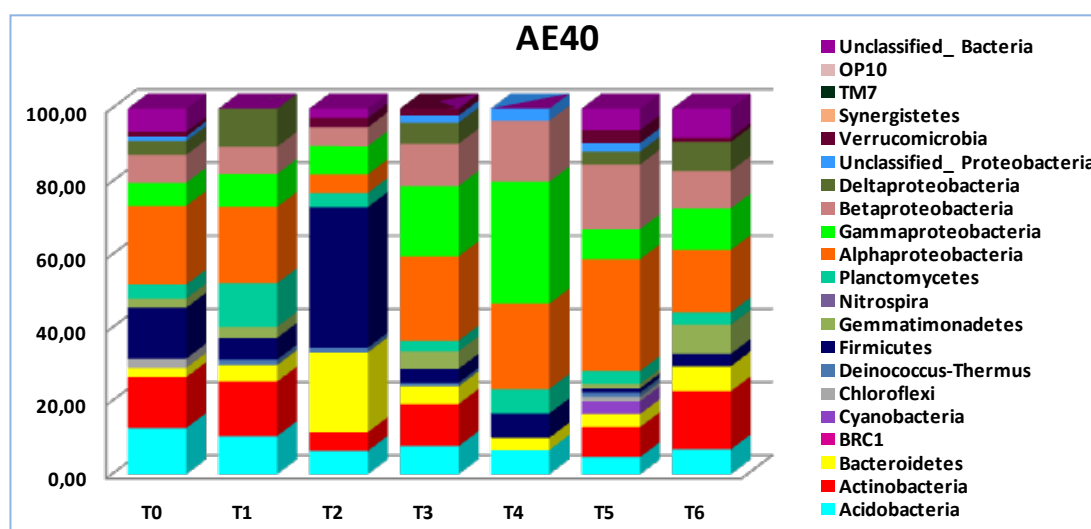
#### 3.5.3.1 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS POR TIPO DE TRATAMIENTO.

En los suelos tratados con lodos de depuradora aerobio hemos comprobado que al incrementar la dosis aplicada se aumentan o disminuyen algunas de las poblaciones bacterianas. En la parcela tratada con la menor dosis de lodo aerobio – 40 t ha<sup>-1</sup> (AE40) (Figura 38) hemos observado que los cambios en las poblaciones bacterianas se manifiestan sobre todo en los primeros análisis, puesto que en los siguientes muestreos los porcentajes son muy similares a los del suelo control. De entre estos cambios, los principales fueron el incremento en la proporción del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Planococcus*, *Planomicrobium* y *Bacillus*) en los primeros análisis, sobre todo en febrero de 2008 (T2), y del filo *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, género *Pontibacter*) también en T2 (Figura 38). Hemos detectado una disminución del filo *Actinobacteria* en febrero de 2008 (T2) y su completa desaparición en octubre de 2008 (T4), y una disminución del filo *Acidobacteria* en febrero de 2008 y 2009 (T2 y T5) y en junio de 2009 (T6) (Figura 38). La proporción del filo *Proteobacteria* varió en algunos muestreos del estudio presentando una disminución de la clase *Gammaproteobacteria* (géneros *Luteimonas* y *Lysobacter*) en los primeros muestreos (T0 a T2) y de *Alphaproteobacteria* en T2 (Figura 38). La clase *Betaproteobacteria* presentó los mayores porcentajes en los cuatro últimos análisis. El filo *Planctomycetes* fue detectado en todos los análisis alcanzando el máximo porcentaje en octubre de 2007 (T1) y el filo *Gemmatimonadetes* en el último muestreo (junio de 2009, T6) (Figura 38).

Estas alteraciones en la población bacteriana fueron igualmente observadas en las comparaciones estadísticas realizadas entre todos los análisis de AE40 con el programa *Libcompare* de *RDP10* (datos no mostrados), sobre todo las mayores proporciones del filo *Firmicutes*, *Bacteroidetes* (T2) y *Planctomycetes* (T1) en los primeros análisis y de *Proteobacteria* (*Alpha* y *Gamma*) en T3 y *Gemmatimonadetes* en T6 y además, la menor proporción de este último filo en T1 (*Gamma*) y en T2 (*Alpha*).

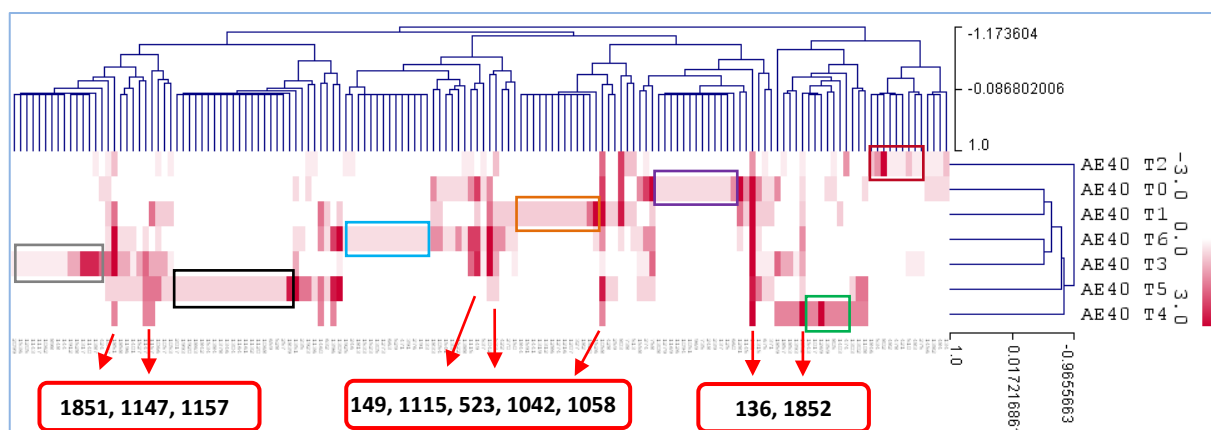
En el análisis de AE40 realizado con *Greengenes* hemos detectado que algunos OTUs están presentes en casi todas las muestras principalmente los que pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (149), *Bacteroidetes* (523), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1058), y a las clases *Alphaproteobacteria* (1115, 1147 y 1157) y *Gammaproteobacteria* (1851 y 1852), (indicados con flechas rojas en la Figura 39). Sin embargo, AE40 T2 (febrero de 2008) es la muestra que se diferencia más del resto de los muestreos, a juzgar por su posición en el árbol generado en el agrupamiento jerárquico de las muestras (*hierarchical clustering*), mientras que T0 es similar a T1, T3 a T6, y T4 a T5 (Figura 39). Dentro de cada muestreo parecen existir poblaciones características de cada uno de ellos que hemos marcado con rectángulos de diferente color. Así, la población “característica” de la muestra de T0 (en violeta) presenta una mayor proporción de secuencias de la clase *Alphaproteobacteria*, al igual que las muestras de T1 (en naranja), T3 (en gris) y de T5 (en negro), aunque formada por distintos OTUs. En el caso de T2, la diferencia puede

residir en una mayor proporción de bacterias de los filos *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (en rojo), aunque estos últimos se encuentran también en todos los muestreos excepto T4 (en verde y Figura 38) y son más abundantes en T6 (en azul) (Figura 39).



Filos – AE40	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<i>Acidobacteria</i>	12,66	10,45	6,41	7,69	6,67	4,71	6,82
<i>Actinobacteria</i>	13,92	14,93	5,13	11,54	0,00	8,24	15,91
<i>Bacteroidetes</i>	2,53	4,48	21,79	4,81	3,33	3,53	6,82
<i>BRC1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cyanobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,53	0,00
<i>Chloroflexi</i>	2,53	0,00	0,00	0,00	0,00	1,18	0,00
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,00	1,49	1,28	0,96	0,00	1,18	0,00
<i>Firmicutes</i>	13,92	5,97	38,46	3,85	6,67	1,18	3,41
<i>Gemmatimonadetes</i>	2,53	2,99	0,00	4,81	0,00	1,18	7,95
<i>Nitrospira</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Planctomycetes</i>	3,80	11,94	3,85	2,88	6,67	3,53	3,41
<i>Proteobacteria</i>	40,51	47,76	17,95	61,54	76,67	62,35	46,59
<i>Alphaproteobacteria</i>	21,52	20,90	5,13	23,08	23,33	30,59	17,05
<i>Gammaproteobacteria</i>	6,33	8,96	7,69	19,23	33,33	8,24	11,36
<i>Betaproteobacteria</i>	7,59	7,46	5,13	11,54	16,67	17,65	10,23
<i>Deltaproteobacteria</i>	3,80	10,45	0,00	5,77	0,00	3,53	7,95
<i>Unclassified Proteobacteria</i>	1,27	0,00	0,00	1,92	3,33	2,35	0,00
<i>Verrucomicrobia</i>	1,27	0,00	2,56	1,92	0,00	3,53	1,14
<i>Synergistetes</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>TM7</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>OP10</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Unclassified Bacteria</i>	6,33	0,00	2,56	0,00	0,00	5,88	7,95

**Figura 38. Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela de suelo tratada con 40 t ha<sup>-1</sup> de lodo aerobio.** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole et al., 2007).

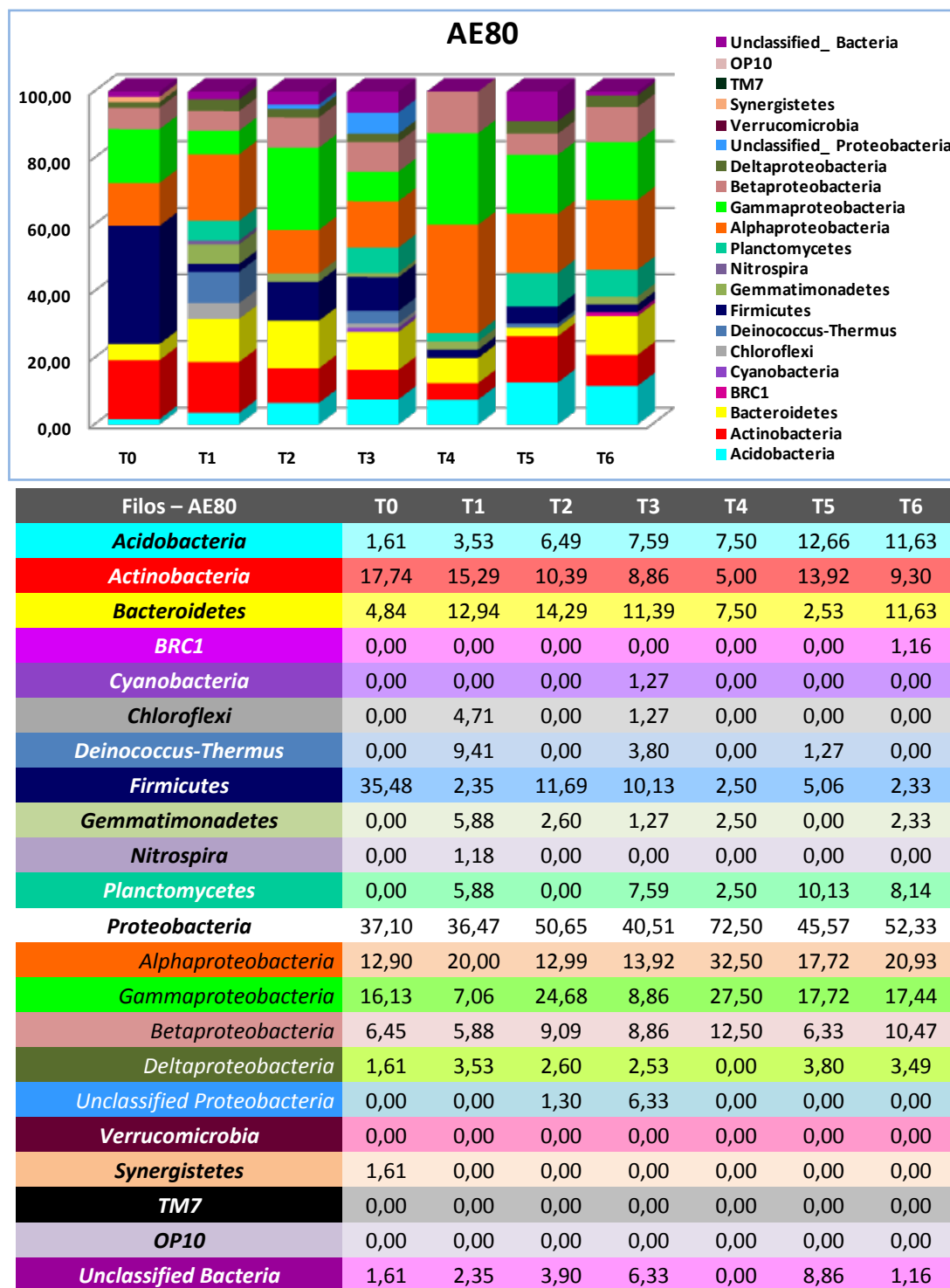


T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
660 <i>Chloroflexi</i>	1520 <i>Deltaprot.</i>	275 <i>Actino.</i>	1387 <i>Betaprot.</i>	474 <i>Bactero.</i>	1839 <i>Gammaprot.</i>	133 <i>Acidob.</i>
125 <i>Acidob.</i>	182 <i>Actino.</i>	483 <i>Bactero.</i>	1140 <i>Alphaprot.</i>	1403 <i>Betaprot.</i>	257 <i>Actino.</i>	191 <i>Actino.</i>
137 <i>Acidob.</i>	327 <i>Actino.</i>	510 <i>Bactero.</i>	1317 <i>Betaprot.</i>	805 <i>Firmicutes</i>	528 <i>Bactero.</i>	276 <i>Actino.</i>
239 <i>Actino.</i>	1207 <i>Alphaprot.</i>	421 <i>Actino.</i>	1528 <i>Deltaprot.</i>	1359 <i>Betaprot.</i>	659 <i>Chloroflexi</i>	391 <i>Actino.</i>
248 <i>Actino.</i>	1216 <i>Alphaprot.</i>	478 <i>Bactero.</i>	1912 <i>Verrucomic.</i>	1269 <i>Alphaprot.</i>	1068 <i>Alphaprot.</i>	471 <i>Bactero.</i>
735 <i>Firmicutes</i>	1274 <i>Alphaprot.</i>	482 <i>Bactero.</i>	144 <i>Acidob.</i>	1017 <i>Firmicutes</i>	1120 <i>Alphaprot.</i>	529 <i>Bactero.</i>
969 <i>Firmicutes</i>	1286 <i>Alphaprot.</i>	802 <i>Firmicutes</i>	148 <i>Actino.</i>	1543 <i>Deltaprot.</i>	1132 <i>Alphaprot.</i>	663 <i>Chloroflexi</i>
1051 <i>Planctom.</i>	1312 <i>Alphaprot.</i>	534 <i>Bactero.</i>	898 <i>Firmicutes</i>		1161 <i>Alphaprot.</i>	1273 <i>Alphaprot.</i>
1094 <i>Alphaprot.</i>	1319 <i>Betaprot.</i>		1062 <i>Alphaprot.</i>		1164 <i>Alphaprot.</i>	1305 <i>Alphaprot.</i>
1126 <i>Alphaprot.</i>	1441 <i>Betaprot.</i>		1117 <i>Alphaprot.</i>		1304 <i>Alphaprot.</i>	1523 <i>Deltaprot.</i>
1169 <i>Alphaprot.</i>	1591 <i>Gammaprot.</i>		1143 <i>Alphaprot.</i>		1346 <i>Betaprot.</i>	1533 <i>Deltaprot.</i>
1279 <i>Alphaprot.</i>	1844 <i>Gammaprot.</i>		1205 <i>Alphaprot.</i>		1378 <i>Betaprot.</i>	1813 <i>Gammaprot.</i>
1308 <i>Alphaprot.</i>			1536 <i>Deltaprot.</i>		1384 <i>Betaprot.</i>	246 <i>Actino.</i>
			2099 <i>Alphaprot.</i>		1534 <i>Deltaprot.</i>	1925 <i>Verrucomic.</i>
					1842 <i>Gammaprot.</i>	
					1920 <i>Verrucomic.</i>	
					1993 <i>Cyanobac.</i>	
					2017 <i>Cyanobac.</i>	

**Figura 39. Comparaciones entre los OTUs presentes en todos los muestreos en AE40. Se llevó a cabo con la aplicación MeV del conjunto de programas TM4.**

En la muestra tratada con 80 t ha<sup>-1</sup> de lodo aerobio (AE80) (Figura 40), hemos observado cambios más significativos en la población bacteriana respecto al suelo control. La proporción de los filos *Acidobacteria* y *Actinobacteria* disminuye en el muestreo de junio de 2007 (T0) mientras que se incrementan el porcentaje de los filos *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Planomicrobium* y *Bacillus*) y *Proteobacteria* (especialmente las clases *Gammaproteobacteria* – géneros *Luteimonas* y *Lysobacter*; y *Alphaproteobacteria* – géneros *Sphingomonas* y *Brevundimonas*) (Figura 40). En el siguiente muestreo (octubre de 2007, T1), la proporción del filo *Firmicutes* disminuye significativamente pero vuelve a incrementarse en los dos análisis posteriores, mientras que el porcentaje del filo *Bacteroidetes* aumenta manteniéndose relativamente constante en los otros análisis (a excepción de una disminución en febrero de 2009, T5) (Figura 40). La clase *Alphaproteobacteria* alcanza las mayores proporciones en T4 y en T6, y *Gammaproteobacteria* en T2 y en T4 (Figura 40). Hemos detectado que el porcentaje del filo *Acidobacteria* fue casi indetectable en el primer muestreo, pero se incrementó gradualmente a lo largo de los 2 años del análisis (Figura 40). El filo *Planctomycetes* fue detectado en algunos muestreos presentando la

mayor proporción en T3, T5 y T6 (Figura 40). Además, hemos observado una mayor proporción de los filos *Deinococcus-Thermus* y *Gemmatimonadetes* en octubre de 2007 (T1) (Figura 40).



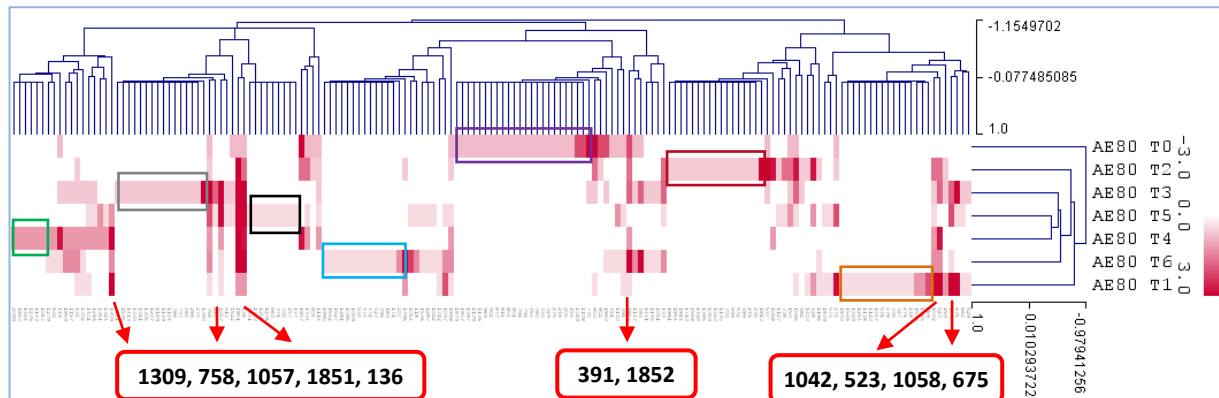
**Figura 40.** Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela de suelo tratada con  $80 \text{ t ha}^{-1}$  de lodo aerobio. Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole et al., 2007).

Estas alteraciones fueron detectadas además en las comparaciones estadísticas entre las poblaciones microbianas realizadas con el programa *Libcompare* de *RDP10* (datos no mostrados), principalmente la mayor proporción del filo *Firmicutes* en el primer muestreo, del filo *Deinococcus-Thermus* y *Gemmatimonadetes* en T1, de *Planctomycetes* en T3, T5 y T6, y de *Bacteroidetes* en T1 y en T2. Además, se observaron en estos análisis la mayor proporción de la clase *Gammaproteobacteria* en T2 y en T4, y de *Alphaproteobacteria* en T4 y en T6.

En el análisis de AE80 realizado con *Greengenes* hemos detectado que algunos OTUs están presentes en casi todas las muestras principalmente los pertenecientes a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (391), *Bacteroidetes* (523), *Deinococcus-Thermus* (675), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1057 y 1058) y las clases *Alphaproteobacteria* (1309) y *Gammaproteobacteria* (1851 y 1852) (flechas rojas en la Figura 41). De entre los análisis, el primer muestreo (junio de 2007, T0) es la muestra que se diferencia más del resto, por su posición en el agrupamiento jerárquico, mientras que T2 es similar a T3, T5, T4; T6 y T1 (Figura 41). Nuevamente, dentro de cada muestreo parecen existir poblaciones características que diferencian a las poblaciones presentes en cada uno de ellos. Así, la población “característica” que diferencia la muestra de T0 (en violeta) de las otras está formada principalmente por los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (sobre todo la clase *Alphaproteobacteria*), mientras que los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*) y *Bacteroidetes* son los característicos en T1 (en naranja). En el caso de T2 (en rojo), la diferencia reside en una mayor proporción de bacterias de los filos *Proteobacteria* (*Gamma* y *Betaproteobacteria*), *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, y estos últimos también se encuentran en los siguientes muestreos junto con una mayor proporción de la clase *Alphaproteobacteria* en T3 (en gris), T4 (en verde) T5 (en negro) y de *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* en el último muestreo (T6, en azul) (Figura 41).

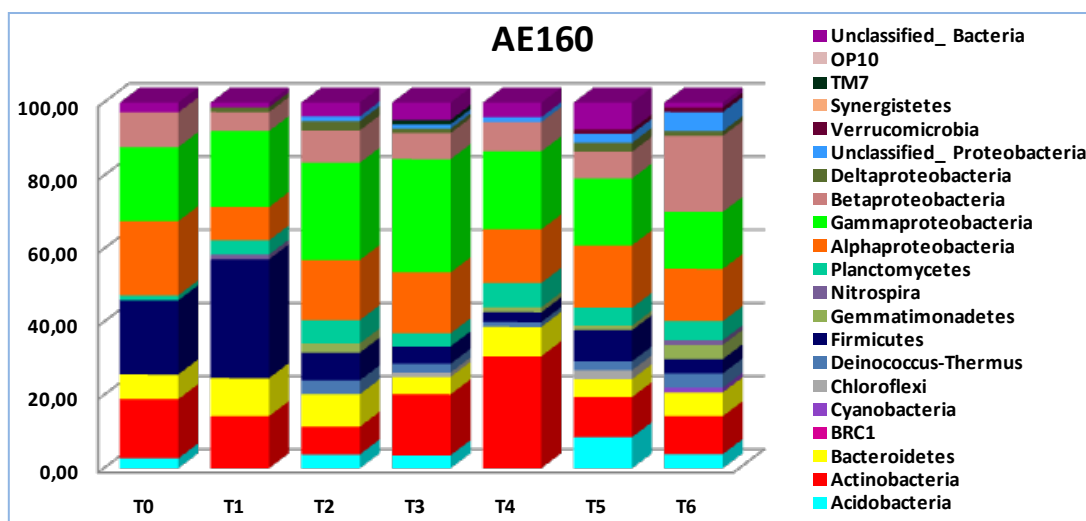
En la muestra tratada con la mayor dosis de lodo aerobio ( $160 \text{ t ha}^{-1}$ , AE160) los cambios en la composición bacteriana son más evidentes (Figura 42). Hemos detectado porcentajes muy bajos del filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) en la mayoría de los muestreos (T0, T2 y T3) alcanzando su proporción máxima en T5 y llegando a desaparecer en T1 y T4 (Figura 42). La proporción del filo *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*) varió entre un incremento (género *Streptomyces*) (T4) y una disminución (género *Agromyces*) (T2). Además, hemos observado un incremento de la clase *Gammaproteobacteria* (géneros *Luteimonas*, *Lysobacter*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*) en T2 y T3, y de *Betaproteobacteria* en T6, junto con una disminución de las clases *Alphaproteobacteria* en T1 (Figura 42). La proporción del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Bacillus*, *Planomicrobium* y *Planococcus*) se incrementó en los primeros muestreos (junio de 2007 – T0 y octubre de 2007 – T1), disminuyendo a lo largo del tiempo. Hemos observado una cierta estabilidad en los porcentajes de bacterias pertenecientes al filo *Bacteroidetes* (sobre todo de la clase *Sphingobacteria*, géneros *Pontibacter* y *Sphingobacterium*) a lo largo del estudio a diferencia del resto de las muestras (Figura 42). La mayor proporción del filo *Firmicutes* en los dos primeros análisis y de *Acidobacteria* en febrero de 2009 (T5) fueron también detectados en las comparaciones realizadas con el *Libcompare* de *RDP10* (datos no mostrados), además de la mayor proporción de *Actinobacteria* sobre todo en T4, de

*Proteobacteria* (Alpha y Gamma principalmente) en T2, T3 y en T6 (Betaproteobacteria).



T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1108 Alphaprot.	659 Chloroflexi	1813 Gammaprot.	1393 Betaprot.	1067 Alphaprot.	137 Acidob.	207 Actino.
1319 Betaprot.	1315 Alphaprot.	235 Actino.	270 Actino.	1143 Alphaprot.	257 Actino.	171 Actino.
154 Actino.	1533 Deltaprot.	245 Actino.	286 Actino.	1276 Alphaprot.	332 Actino.	183 Actino.
205 Actino.	148 Actino.	489 Bactero.	484 Bactero.	1454 Betaprot.	371 Actino.	396 Actino.
246 Actino.	276 Actino.	532 Bactero.	737 Firmicutes	1853 Gammaprot.	663 Chloroflexi	427 Actino.
275 Actino.	327 Actino.	699 Firmicutes	786 Firmicutes	2099 Alphaprot.	1236 Alphaprot.	472 Bactero.
329 Actino.	335 Actino.	700 Firmicutes	1104 Alphaprot.		1258 Alphaprot.	474 Bactero.
334 Actino.	478 Bactero.	1130 Alphaprot.	1149 Alphaprot.		1303 Alphaprot.	534 Bactero.
360 Actino.	531 Bactero.	1323 Betaprot.	1159 Alphaprot.		1541 Deltaprot.	1059 Planctom.
454 Bactero.	1047 Nitrosp.	1359 Betaprot.	1207 Alphaprot.			1095 Alphaprot.
792 Firmicutes	1123 Alphaprot.	1385 Betaprot.	1305 Alphaprot.			1281 Alphaprot.
796 Firmicutes	1138 Alphaprot.	1460 Betaprot.	1311 Alphaprot.			1527 Deltaprot.
801 Firmicutes	1254 Alphaprot.	1558 Deltaprot.	1330 Betaprot.			1542 Deltaprot.
804 Firmicutes	1329 Betaprot.	1710 Gammaprot.	1413 Betaprot.			1990 BRC1
815 Firmicutes	1526 Deltaprot.	1814 Gammaprot.	1535 Deltaprot.			
877 Firmicutes	1833 Gammaprot.	1854 Gammaprot.	2001 Cyanobac.			
902 Firmicutes		1861 Gammaprot.				
969 Firmicutes						
1136 Alphaprot.						
1139 Alphaprot.						
1387 Betaprot.						
1807 Gammaprot.						
1879 Synergis.						

**Figura 41. Comparaciones entre los OTUs presentes en todos los muestreos en AE80. Se llevó a cabo con la aplicación MeV del conjunto de programas TM4.**



Filos – AE160	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>Acidobacteria</b>	2,70	0,00	3,80	3,57	0,00	8,54	3,90
<b>Actinobacteria</b>	16,22	14,29	7,59	16,67	30,67	10,98	10,39
<b>Bacteroidetes</b>	6,76	10,39	8,86	4,76	8,00	4,88	6,49
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30
<b>Chloroflexi</b>	0,00	0,00	0,00	1,19	0,00	2,44	0,00
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	0,00	3,80	2,38	1,33	2,44	3,90
<b>Firmicutes</b>	20,27	32,47	7,59	4,76	2,67	8,54	3,90
<b>Gemmatimonadetes</b>	0,00	0,00	2,53	0,00	1,33	1,22	3,90
<b>Nitrospira</b>	0,00	1,30	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30
<b>Planctomycetes</b>	1,35	3,90	6,33	3,57	6,67	4,88	5,19
<b>Proteobacteria</b>	50,00	36,36	55,70	57,14	45,33	47,56	57,14
<b>Alphaproteobacteria</b>	20,27	9,09	16,46	16,67	14,67	17,07	14,29
<b>Gammaproteobacteria</b>	20,27	20,78	26,58	30,95	21,33	18,29	15,58
<b>Betaproteobacteria</b>	9,46	5,19	8,86	7,14	8,00	7,32	20,78
<b>Deltaproteobacteria</b>	0,00	1,30	2,53	1,19	0,00	2,44	1,30
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	0,00	0,00	1,27	1,19	1,33	2,44	5,19
<b>Verrucomicrobia</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22	1,30
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	1,19	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	2,70	1,30	3,80	4,76	4,00	7,32	1,30

**Figura 42.** Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela de suelo tratada con  $160 \text{ t ha}^{-1}$  de lodo aerobio. Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).



Existen algunos OTUs presentes en casi todas las muestras en AE160, principalmente los pertenecientes a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (149, 274, 371), *Deinococcus-Thermus* (675), *Firmicutes* (758), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1057 y 1058) y las clases *Alphaproteobacteria* (1066, 1068 y 1115), *Betaproteobacteria* (1403) y *Gammaproteobacteria* (1851 y 1852) (flechas rojas en la Figura 43). En el agrupamiento jerárquico de las muestras, los primeros muestreos (T0 a T2) son similares, mientras que T3, T4, T5 y T6 se parecen más entre sí (Figura 43). Dentro de cada muestreo parecen existir poblaciones características que diferencian los análisis. Así, la población “característica” que diferencia la muestra de T0 (en violeta) de las otras está compuesta por secuencias de los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (*Alpha* y *Betaproteobacteria*), mientras que los filos *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* son los más abundantes en T1 (en naranja). En el caso de T2 (en rojo), la diferencia reside en una mayor proporción de bacterias de los filos *Proteobacteria* (*Gamma* y *Betaproteobacteria*), *Bacteroidetes* y una menor proporción de *Actinobacteria* y *Planctomycetes*, en T3 (en gris) una mayor proporción de *Actinobacteria* y de la clase *Alphaproteobacteria*, mientras que en T4 (en verde) predominan estos últimos grupos más el filo *Bacteroidetes* y la clase *Betaproteobacteria*. En los dos últimos muestreos (T5, en negro; T6, en azul), los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria* y *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gammaproteobacteria*) son los que diferencian esas muestras de las otras (Figura 43).

Las muestras tratadas con menores dosis de lodo anaerobio (40 y 80 t ha<sup>-1</sup> - ANAE40 y ANAE80) (Figura 44 y Figura 45) presentan poblaciones bacterianas muy similares, puesto que hemos detectado un incremento en los 3 primeros muestreos (T0 a T2) del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Bacillus*, *Planomicrobium* y *Planococcus*) seguido de una disminución, siendo más patente ese incremento en ANAE40 (Figura 44). Hemos observado en ANAE40 que la proporción de la clase *Gammaproteobacteria* se mantuvo relativamente constante en casi todos los análisis, mientras que en ANAE80 se detecta una mayor proporción de esa clase en T2, T4 y T5. La proporción de la clase *Alphaproteobacteria* sufrió pocas variaciones en ANAE40 (Figura 44), mientras que en ANAE80 existe un menor porcentaje de esas bacterias alcanzando los valores más elevados en T3 y en T6 (Figura 45). El porcentaje de las clases *Betaproteobacteria* (género *Corallococcus*) y *Deltaproteobacteria* casi no varió en ANAE40, a excepción del incremento de *Betaproteobacteria* observado en el último muestreo (T6) (Figura 44). En ANAE80 las mayores proporciones del filo *Betaproteobacteria* fueron detectadas en T3 y T6, mientras que los porcentajes de la clase *Deltaproteobacteria* aumentaron en T1 y en T5 pero desaparecieron en T2 y T3 (Figura 45). El porcentaje de los filos *Acidobacteria* ha disminuido en algunos análisis (T4 en ANAE40; T1, T2 y T4 en ANAE80) y se ha incrementado en otros (Figura 44 y Figura 45). El filo *Bacteroidetes* fue casi indetectable en algunos análisis (T0 en ANAE40; T5 y T6 en ANAE80), manteniéndose relativamente constante en el resto (Figura 44 y Figura 45). El filo *Actinobacteria* se incrementó en T4 y T5 en ANAE40 (Figura 44), alcanzando su menor porcentaje en el muestreo de junio de 2008 (T3) en ANAE80 (Figura 45).

Estas variaciones en la población microbiana de ANAE40 y ANAE80, fueron también detectadas en las comparaciones realizadas entre los análisis con el

Libcompare de RDP10 (datos no mostrados). En ANAE40 las principales diferencias se manifestaron en la menor proporción del filo *Bacteroidetes* en el primer análisis (T0) y de *Firmicutes* en T0, T1 y T2, y en la mayor proporción de *Betaproteobacteria* en el último muestreo (T6) y de *Actinobacteria* en T4 y en T5. En ANAE80 se detectaron las mayores proporciones de *Proteobacteria* en T2, T4 y T5 (*Gamma*; *Delta* en T1 y en T5), y en T3 y T6 (*Alpha*), y de *Bacteroidetes* en T1.

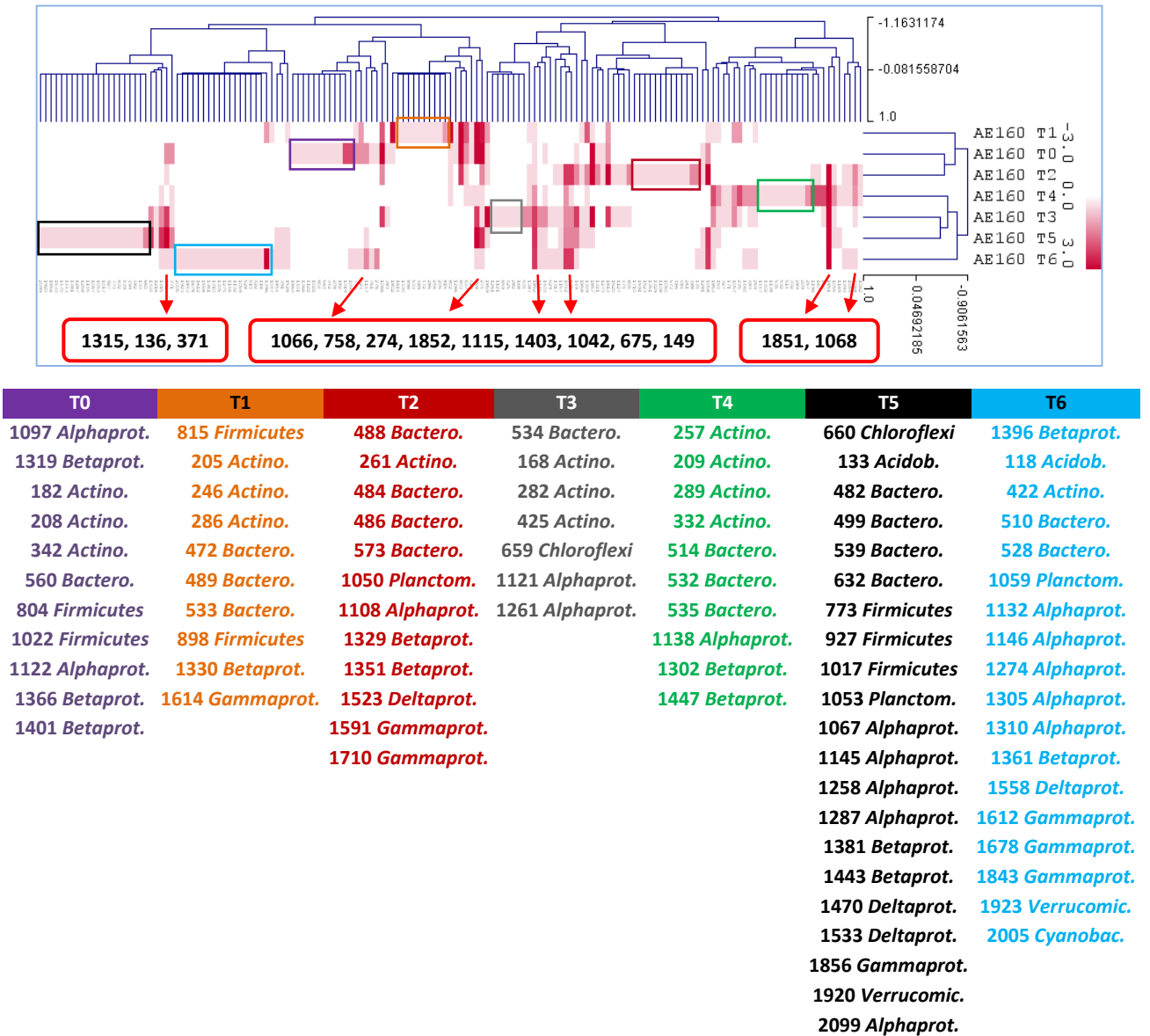
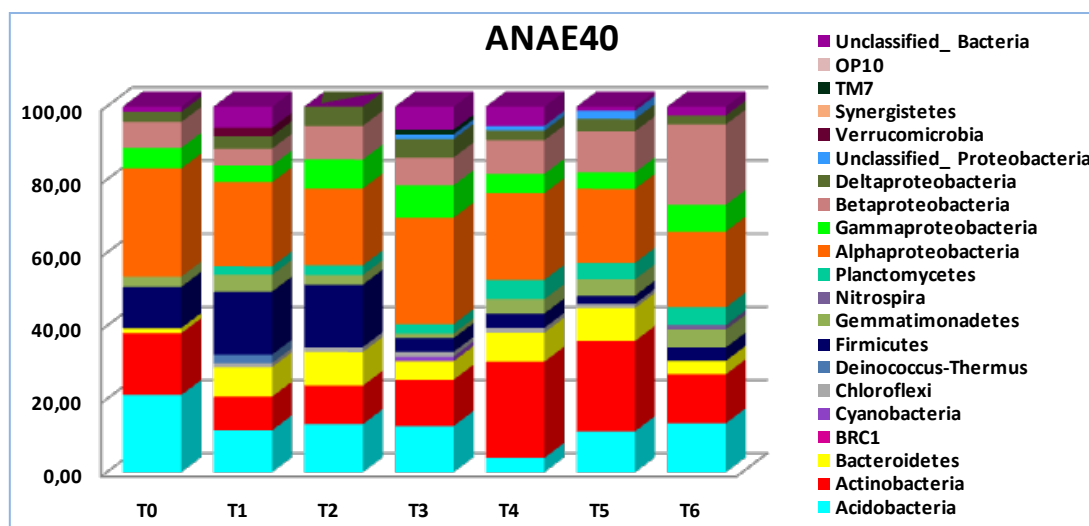
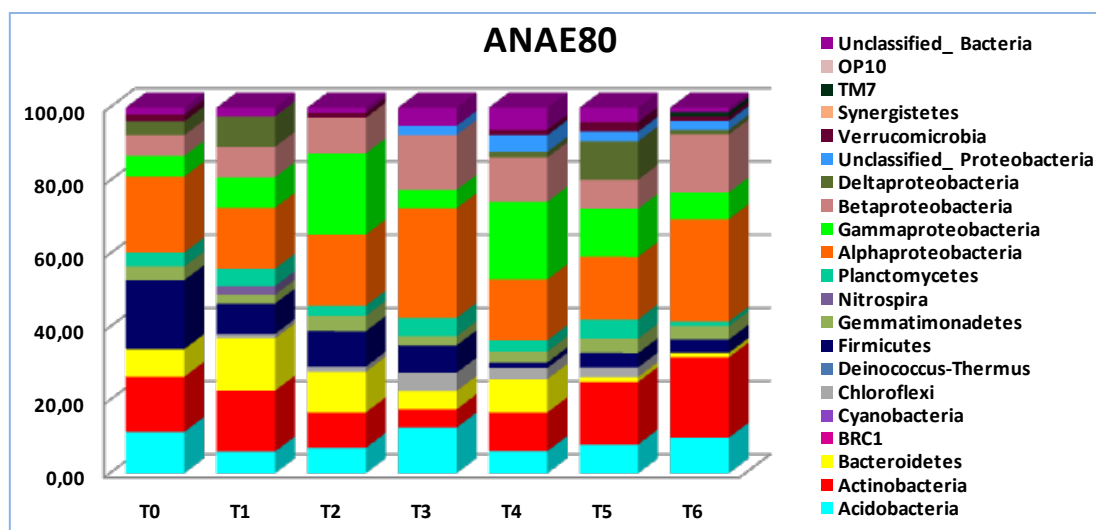


Figura 43. Comparaciones entre los OTUs presentes en todos los muestreos en AE160. Se llevó a cabo con la aplicación MeV del conjunto de programas TM4.



Filos – ANAE40	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>Acidobacteria</b>	21,13	11,49	13,16	12,66	3,95	11,24	13,41
<b>Actinobacteria</b>	16,90	9,20	10,53	12,66	26,32	24,72	13,41
<b>Bacteroidetes</b>	1,41	8,05	9,21	5,06	7,89	8,99	3,66
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	0,00	1,15	1,32	1,27	1,32	1,12	0,00
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	11,27	17,24	17,11	3,80	3,95	2,25	3,66
<b>Gemmatimonadetes</b>	2,82	4,60	2,63	1,27	3,95	4,49	4,88
<b>Nitrospira</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22
<b>Planctomycetes</b>	0,00	2,30	2,63	2,53	5,26	4,49	4,88
<b>Proteobacteria</b>	45,07	35,63	43,42	51,90	42,11	41,57	52,44
<i>Alphaproteobacteria</i>	29,58	22,99	21,05	29,11	23,68	20,22	20,73
<i>Gammaproteobacteria</i>	5,63	4,60	7,89	8,86	5,26	4,49	7,32
<i>Betaproteobacteria</i>	7,04	4,60	9,21	7,59	9,21	11,24	21,95
<i>Deltaproteobacteria</i>	2,82	3,45	5,26	5,06	2,63	3,37	2,44
<i>Unclassified Proteobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	1,27	1,32	2,25	0,00
<i>Verrucomicrobia</i>	0,00	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Synergistetes</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	1,41	5,75	0,00	6,33	5,26	1,12	2,44

**Figura 44. Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela de suelo tratada con 40 t ha<sup>-1</sup> de lodo anaerobio.** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole et al., 2007).

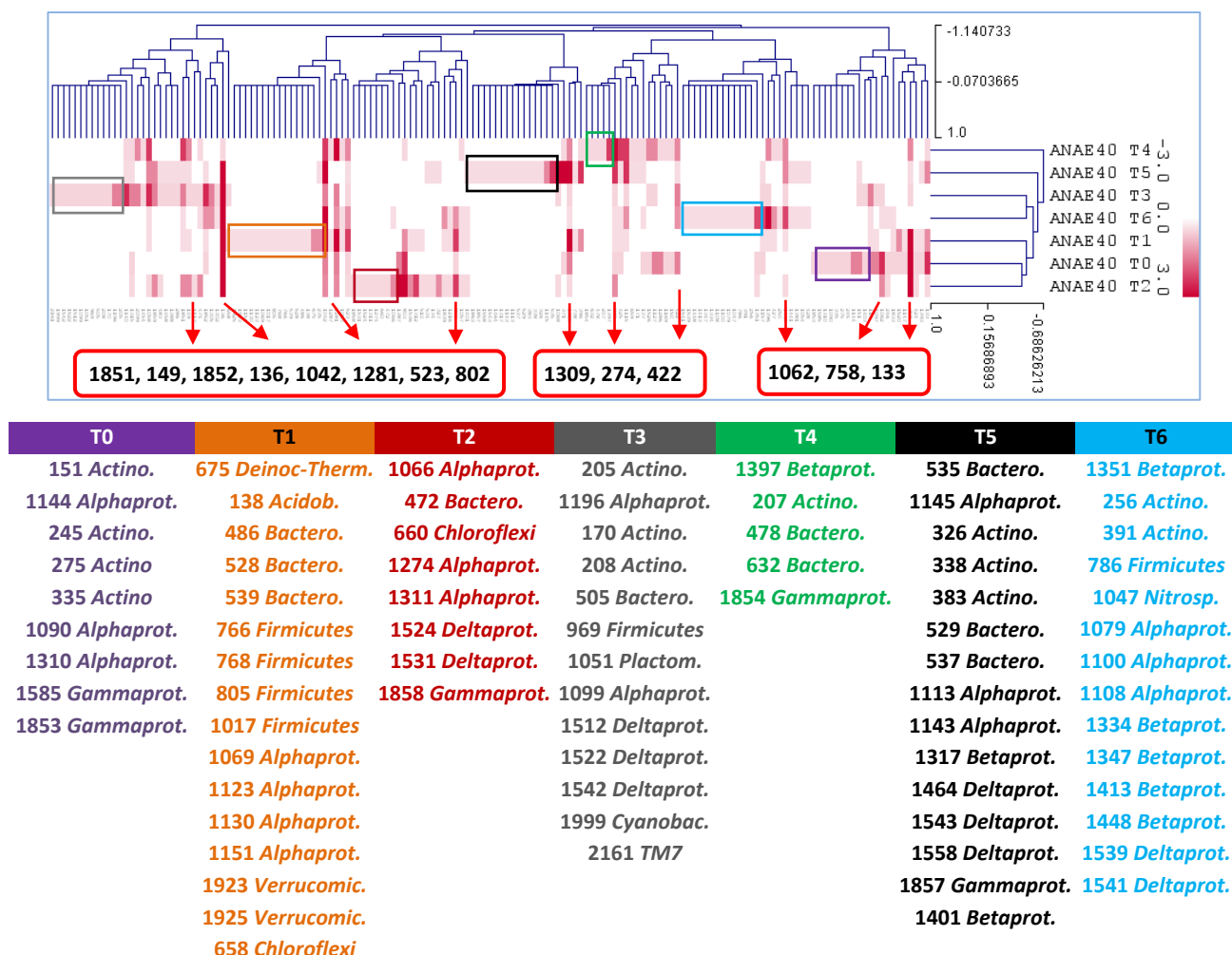


Filos – ANAE80	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>Acidobacteria</b>	11,32	5,95	6,94	12,50	6,06	7,89	9,76
<b>Actinobacteria</b>	15,09	16,67	9,72	5,00	10,61	17,11	21,95
<b>Bacteroidetes</b>	7,55	14,29	11,11	5,00	9,09	1,32	1,22
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	0,00	1,19	1,39	5,00	3,03	2,63	0,00
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	18,87	8,33	9,72	7,50	1,52	3,95	3,66
<b>Gemmatimonadetes</b>	3,77	2,38	4,17	2,50	3,03	3,95	3,66
<b>Nitrospira</b>	0,00	2,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Planctomycetes</b>	3,77	4,76	2,78	5,00	3,03	5,26	1,22
<b>Proteobacteria</b>	35,85	41,67	51,39	52,50	56,06	51,32	54,88
<b>Alphaproteobacteria</b>	20,75	16,67	19,44	30,00	16,67	17,11	28,05
<b>Gammaproteobacteria</b>	5,66	8,33	22,22	5,00	21,21	13,16	7,32
<b>Betaproteobacteria</b>	5,66	8,33	9,72	15,00	12,12	7,89	15,85
<b>Deltaproteobacteria</b>	3,77	8,33	0,00	0,00	1,52	10,53	1,22
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	2,50	4,55	2,63	2,44
<b>Verrucomicrobia</b>	1,89	0,00	1,39	0,00	1,52	2,63	1,22
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	1,89	2,38	1,39	5,00	6,06	3,95	1,22

**Figura 45. Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela de suelo tratada con 80 t ha<sup>-1</sup> de lodo anaerobio.** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).

Existen algunos OTUs en ANAE40 comunes a casi todos los análisis y que se encuentran en una proporción similar en casi todas las muestras y que pertenecen a los filos *Acidobacteria* (133 y 136), *Actinobacteria* (149, 274 y 422), *Bacteroidetes* (523), *Firmicutes* (758 y 802), *Gemmatimonadetes* (1042) y las clases *Alphaproteobacteria* (1062, 1281, 1309) y *Gamaproteobacteria* (1851 y 1852) (flecha roja en la Figura 46). En el agrupamiento jerárquico de las muestras, el muestreo de octubre de 2008 (T4) es el más distinto entre todos, mientras que T5 es similar a T3 y T6, y los muestreos iniciales (T0, T1 y T2) son parecidos (Figura 46). Nuevamente, cada muestra se caracteriza por un grupo bacteriano que hace cada muestreo distinto uno del otro. Así, el primer análisis (T0, en violeta) se diferencia por la presencia de algunas especies de los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (*Alpha* y *Gamma*), mientras que en T1 (en naranja) además de estos grupos, se detectan bacterias de los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi*. El muestreo de febrero de 2008 (T2, en rojo) se diferencia solamente por OTUs de los filos *Proteobacteria* (*Alpha*, *Delta* y *Gamma*), *Bacteroidetes* y *Chloroflexi*, mientras que en T3 (en gris) además de estos grupos, se diferencia por la presencia de *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria* y *TM7* (Figura 46). En T4 (en verde) solo unas pocas especies pertenecientes a los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (*Beta* y *Gamma*) diferencian ese muestreo de los otros, mientras que una mayor proporción de estos filos y de la clase *Deltaproteobacteria* diferencian los dos últimos muestreos (T5, en negro; T6, en azul) (Figura 46).

En ANAE80 hemos observado que los OTUs que son similares entre todas las muestras pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (274 y 422), *Bacteroidetes* (523), *Firmicutes* (758 y 803), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1058) y las clases *Alphaproteobacteria* (1115 y 1309) y *Gamaproteobacteria* (1839, 1851 y 1852) (indicados con una flecha roja en la Figura 47). En el agrupamiento jerárquico de las muestras, hemos observado que ANAE80 en el muestreo de octubre de 2007 (T1) es la más distinta entre todas, mientras que T2 es similar a T4, y T0 se parece a T3, T5 y T6 (Figura 47). En T0 (violeta) son pocos los OTUs que diferencian ese muestreo del resto, de entre ellos los pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (*Alpha*) y *Firmicutes*, mientras que en T1 (naranja) además de estos filos, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Nitrospira* hacen a esa muestra ser más distinta del resto. En T2 (rojo), en T3 (gris) y en T4 (verde), los OTUs que diferencian esas muestras entre sí son pocos, y pertenecen a los filos *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*), *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* y *OP10*. En T5 (negro) y en T6 (azul), una mayor proporción de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (*Alpha*, *Delta* y *Beta*) y *Verrucomicrobia* diferencian esas muestras de las otras (Figura 47).

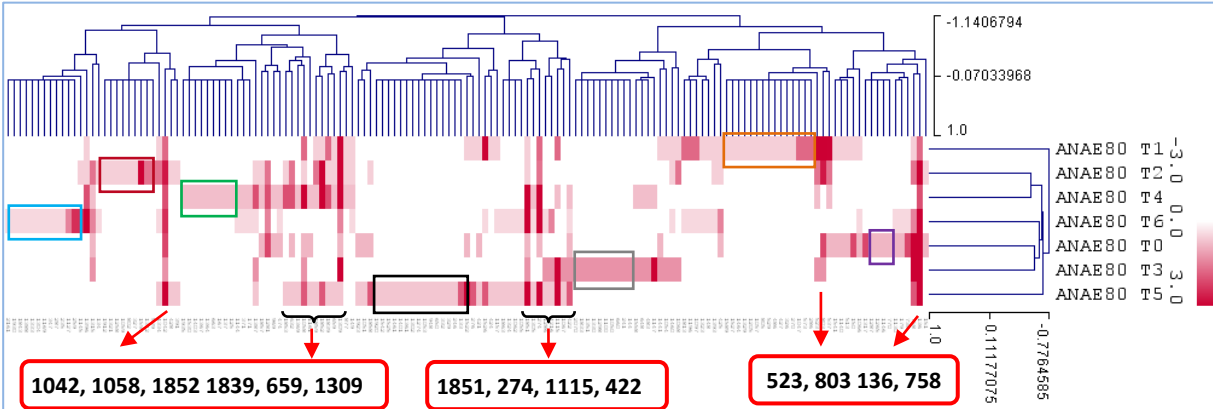


**Figura 46. Comparaciones entre los OTUs presentes en todos los muestreos en ANAE40. Se llevó a cabo con la aplicación MeV del conjunto de programas TM4.**

En la muestra tratada con mayor dosis de lodo anaerobio ( $160 \text{ t ha}^{-1}$ , ANAE160) (Figura 48), hemos detectado poblaciones bacterianas similares a la muestra AE160. Existe una disminución significativa en la proporción del filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) llegando a niveles muy bajos en T1, T4 y T5, y desapareciendo en el primer muestreo (T0) (Figura 48). La proporción del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Planomicrobium* y *Bacillus*) se incrementó principalmente en el primer muestreo (T0) y en T1 manteniéndose relativamente constante en los restantes análisis. Hemos observado también una disminución del filo *Bacteroidetes* (género *Sphingomonas*) en algunos muestreos (T0, T3 y T4) y de las clases *Gammaproteobacteria* (en T2 y sobre todo en T1) y *Alphaproteobacteria* (T0), y la completa desaparición de la clase *Deltaproteobacteria* en T0 y en T4. El porcentaje del filo *Actinobacteria* se mantuvo relativamente constante observándose una disminución en T3 y en T6 (Figura 48). Los filos *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* aparecieron en casi todos los análisis, a excepción del primer muestreo (T0) (Figura 48).

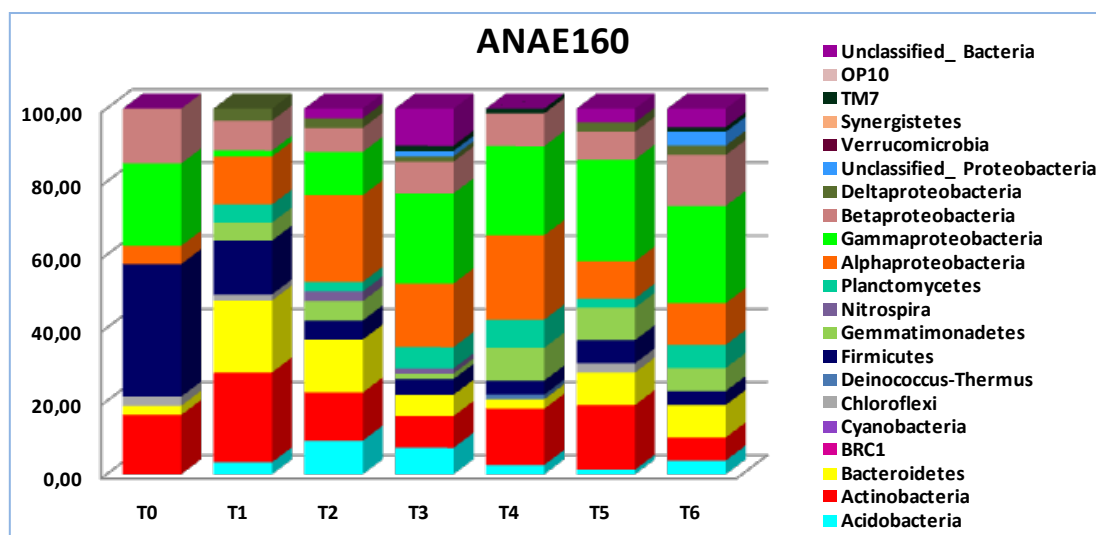
El incremento del filo *Firmicutes*, *Actinobacteria* y de la clase *Gammaproteobacteria*, y la disminución de *Bacteroidetes* y de la clase

*Alphaproteobacteria*, y la desaparición de *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* en el primer muestreo fueron observados también en las comparaciones estadísticas realizadas con el *Libcompare* de *RDP10* (datos no mostrados). Además, se observaron en estos análisis las menores proporciones de *Acidobacteria* en T1, T4 y T5, y las mayores proporciones de la clase *Gammaproteobacteria* en los cuatro últimos análisis, de los filos *Bacteroidetes* en T1 y T2, *Gemmatimonadetes* en T4, T5 y T6, y *Planctomycetes* en T4 y en T6.



T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
770 <i>Firmicutes</i>	286 <i>Actino.</i>	539 <i>Bactero.</i>	144 <i>Acidob.</i>	125 <i>Acidob.</i>	133 <i>Acidob.</i>	259 <i>Actino.</i>
1146 <i>Alphaprot.</i>	573 <i>Bactero.</i>	1312 <i>Alphaprot.</i>	241 <i>Actino.</i>	137 <i>Acidob.</i>	246 <i>Actino.</i>	1127 <i>Alphaprot.</i>
1265 <i>Alphaprot.</i>	1047 <i>Nitrosp.</i>	1591 <i>Gammaprot.</i>	660 <i>Chloroflexi</i>	167 <i>Actino.</i>	329 <i>Actino.</i>	235 <i>Actino.</i>
1287 <i>Alphaprot.</i>	270 <i>Actino.</i>	327 <i>Actino.</i>	1050 <i>Planctom.</i>	663 <i>Chloroflexi</i>	332 <i>Actino.</i>	287 <i>Actino.</i>
	326 <i>Actino.</i>	802 <i>Firmicutes</i>	1100 <i>Alphaprot.</i>	1364 <i>Betaprot.</i>	650 <i>Chloroflexi</i>	347 <i>Actino.</i>
	427 <i>Actino.</i>	1059 <i>Planctom.</i>	1298 <i>Alphaprot.</i>	1367 <i>Betaprot.</i>	948 <i>Firmicutes</i>	1169 <i>Alphaprot.</i>
	486 <i>Bactero.</i>	1258 <i>Alphaprot.</i>	1330 <i>Betaprot.</i>	1403 <i>Betaprot.</i>	1053 <i>Planctom.</i>	1304 <i>Alphaprot.</i>
	529 <i>Bactero.</i>	1321 <i>Betaprot.</i>	1351 <i>Betaprot.</i>	1530 <i>Deltaprot.</i>	1274 <i>Alphaprot.</i>	1333 <i>Betaprot.</i>
	805 <i>Firmicutes</i>	1912 <i>Verrucomic.</i>	1833 <i>Gammaprot.</i>	1935 <i>Verrucomic.</i>	1302 <i>Alphaprot.</i>	1388 <i>Betaprot.</i>
	1057 <i>Planctom.</i>	134 <i>Acidob.</i>	2070 <i>OP10</i>		1361 <i>Betaprot.</i>	1843 <i>Gammaprot.</i>
	1205 <i>Alphaprot.</i>				1401 <i>Betaprot.</i>	1930 <i>Verrucomic.</i>
	1329 <i>Betaprot.</i>				1461 <i>Deltaprot.</i>	2161 <i>TM7</i>
	1464 <i>Deltaprot.</i>				1525 <i>Deltaprot.</i>	
	1527 <i>Deltaprot.</i>				1542 <i>Deltaprot.</i>	
	1589 <i>Gammaprot.</i>				1920 <i>Verrucomic.</i>	

**Figura 47.** Comparaciones entre los OTUs presentes en todos los muestreos en ANAE80. Se llevó a cabo con la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

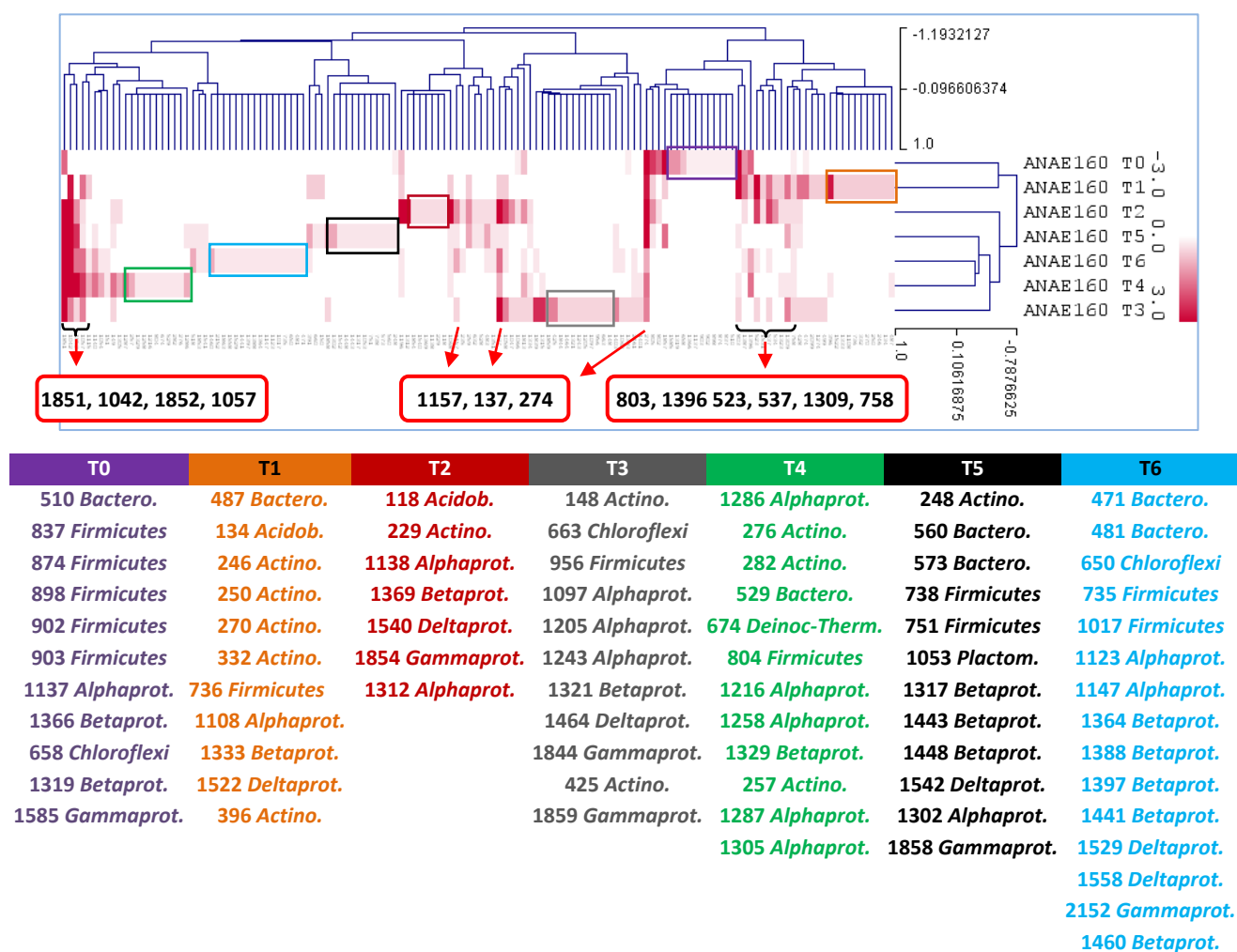


Filos – ANAE160	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<i>Acidobacteria</i>	0,00	3,28	9,21	7,25	2,56	1,27	3,80
<i>Actinobacteria</i>	16,25	24,59	13,16	8,70	15,38	17,72	6,33
<i>Bacteroidetes</i>	2,50	19,67	14,47	5,80	2,56	8,86	8,86
<i>BRC1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cyanobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Chloroflexi</i>	2,50	1,64	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	0,00	0,00
<i>Firmicutes</i>	36,25	14,75	5,26	4,35	3,85	6,33	3,80
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,00	4,92	5,26	1,45	8,97	8,86	6,33
<i>Nitrospira</i>	0,00	0,00	2,63	1,45	0,00	0,00	0,00
<i>Planctomycetes</i>	0,00	4,92	2,63	5,80	7,69	2,53	6,33
<i>Proteobacteria</i>	42,50	26,23	44,74	53,62	56,41	48,10	58,23
<i>Alphaproteobacteria</i>	5,00	13,11	23,68	17,39	23,08	10,13	11,39
<i>Gammaproteobacteria</i>	22,50	1,64	11,84	24,64	24,36	27,85	26,58
<i>Betaproteobacteria</i>	15,00	8,20	6,58	8,70	8,97	7,59	13,92
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,00	3,28	2,63	1,45	0,00	2,53	2,53
<i>Unclassified Proteobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	1,45	0,00	0,00	3,80
<i>Verrucomicrobia</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Synergistetes</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>TM7</i>	0,00	0,00	0,00	1,45	1,28	0,00	1,27
<i>OP10</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Unclassified Bacteria</i>	0,00	0,00	2,63	10,14	0,00	3,80	5,06

**Figura 48. Composición de la comunidad bacteriana presente en la parcela de suelo tratada con 160 t ha<sup>-1</sup> de lodo anaerobio.** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).



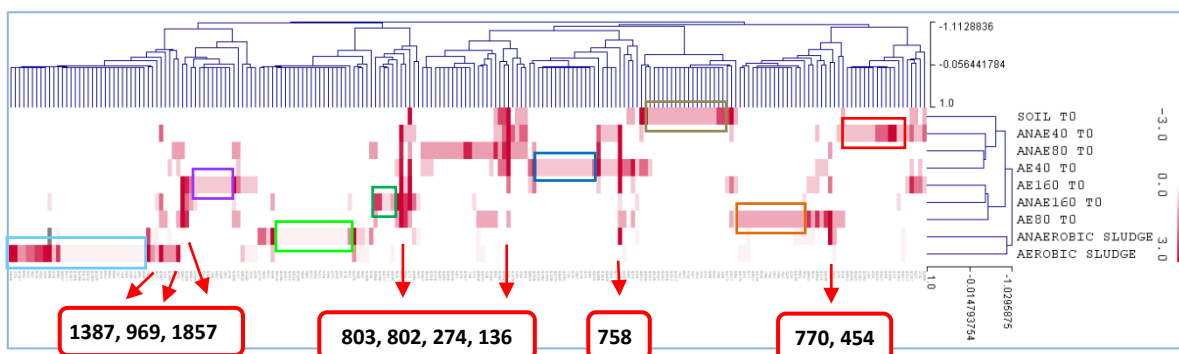
El análisis de agrupamiento jerárquico de la composición en OTUs de ANAE160 muestra que los primeros análisis son similares (T0 y T1), mientras que T2 es más parecido a T3, T4, T5 y T6 (Figura 49). Los OTUs más comunes entre todas las muestras pertenecen a los filos *Acidobacteria* (137), *Bacteroidetes* (523 y 537), *Firmicutes* (758 y 803), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1057) y las clases *Alphaproteobacteria* (1157 y 1309), *Betaproteobacteria* (1396) y *Gammaproteobacteria* (1851 y 1852) (flecha roja en la Figura 49). En T0 (violeta), los OTUs que le diferencian de las otras muestras son principalmente aquellos que pertenecen a los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta* y *Gamma*), mientras que en T1 (naranja) además de estos filos, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* también lo hacen distinto, al igual que en T2 (naranja) pero en menor proporción. En T3 (gris) las diferencias residen en los filos *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*), *Actinobacteria* y *Chloroflexi*, mientras que T4 (verde) se diferencia por los mismos filos (a excepción de *Chloroflexi*) además de *Deinococcus-Thermus*. Los filos que diferencian en T5 y el T6 son básicamente *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*), *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Figura 49).

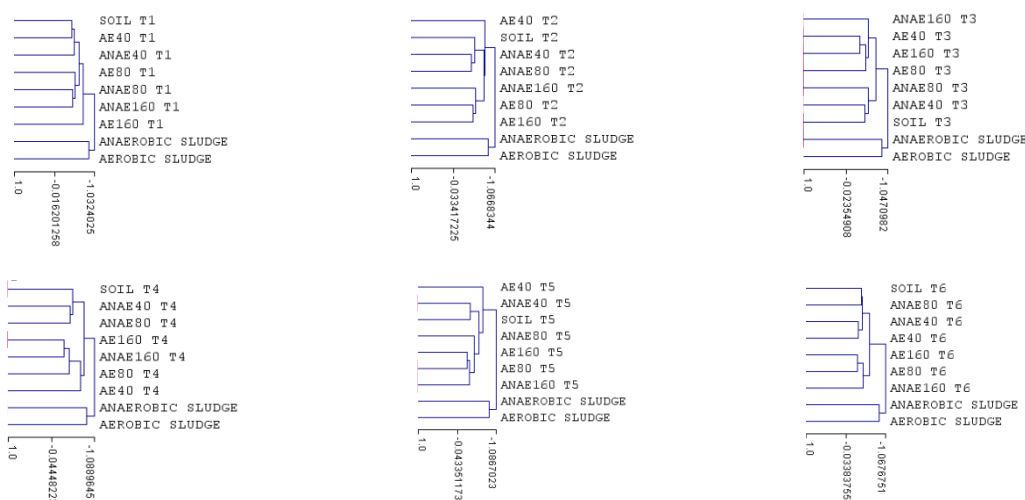


**Figura 49. Comparaciones entre los OTUs presentes en todos los muestreos en ANAE160.** Se llevó a cabo con la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

### 3.5.3.2 INFLUENCIA DE LOS LODOS EN LAS MUESTRAS DE SUELO.

Con el fin de comprobar si los lodos influyen en las poblaciones de las distintas parcelas tratadas introduciendo microorganismos procedentes de su composición hemos comparado las poblaciones presentes en los lodos y en las muestras utilizando los datos de clasificación proporcionados por *Greengenes* con la ayuda de la aplicación MeV mediante un agrupamiento jerárquico. Como se puede comprobar en la Figura 50, los lodos aerobio y anaerobio se agrupan separadamente de las muestras y presentan un conjunto de OTUs exclusivos. Gran parte de los OTUs presentes en los lodos no se encuentran entre los detectados en las muestras tratadas y tampoco en los detectados en el suelo control (*Soil*). Como prueba de ello, algunos grupos de OTUs existen solamente en los lodos aerobio y anaerobio y no están presentes en ninguna de las muestras de nuestro estudio (lodo aerobio, en azul; lodo anaerobio en verde) (Figura 50). Sin embargo, algunos OTUs son similares entre casi todas las muestras y pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136), *Bacteroidetes* (454), *Firmicutes* (758, 770, 802, 803 y 969) y a la clase *Gammaproteobacteria* (1857) y *Betaproteobacteria* (1387) (flecha roja en la Figura 50). De entre ellos, los que son similares entre los lodos y las muestras de suelo tratadas son los OTUs de los filos *Firmicutes* (758, 770 y 969), *Bacteroidetes* (454) y de la clase *Betaproteobacteria* (1387), no detectando esa similitud con el suelo control, a excepción de la presencia del OTU 969 en esta muestra (Figura 50). En general, el suelo control fue más parecido en su composición a las muestras tratadas con las menores dosis de lodo (AE40 y ANAE40) en la mayoría de los muestreos y en algunos momentos con ANAE80, siendo siempre distinta a las muestras tratadas con las mayores dosis (AE160 y ANAE160). Éstas últimas fueron similares entre sí en casi todos los muestreos y además, a AE80 (T2, T3, T4 y T6), ANAE80 (T1 y T5) e incluso a AE40 (T4). Las muestras más cercanas al grupo de los lodos fueron las tratadas con las mayores dosis (AE160 en T1 y T2; ANAE160 en T5 y T6) y AE80 en el primer muestreo (T0) y en febrero de 2008 (T2), y AE40 en octubre de 2008 (T4), pero ninguna de ellas se agrupó con los lodos directamente (Figura 50). A partir del primer muestreo, el número de OTUs compartidos entre los lodos y las muestras de mayor dosis desciende notablemente, razón por la que no se muestran esas comparaciones salvo en el agrupamiento jerárquico (Figura 50). Esos OTUs pertenecen al filo *Firmicutes* (758) y a la clase *Betaproteobacteria* (1387), aunque este último desaparece de la composición de las parcelas a partir del muestreo T3.





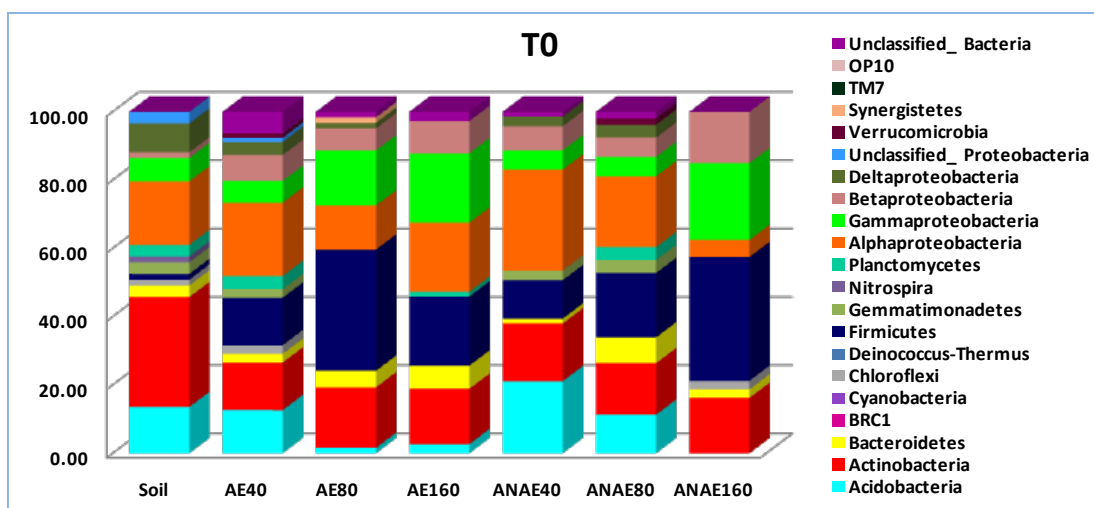
Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
1273 <i>Alphaprot.</i>	1145 <i>Alphaprot.</i>	902 <i>Firmicutes</i>	276 <i>Actino.</i>	1403 <i>Betaprot.</i>	1522 <i>Deltaprot.</i>	1196 <i>Alphaprot.</i>
326 <i>Actino.</i>	125 <i>Acidob.</i>	815 <i>Firmicutes</i>	383 <i>Actino.</i>	1157 <i>Alphaprot.</i>	421 <i>Actino.</i>	510 <i>Bactero.</i>
396 <i>Actino.</i>	134 <i>Acidob.</i>	1136 <i>Alphaprot.</i>	428 <i>Actino.</i>	1393 <i>Betaprot.</i>	1140 <i>Alphaprot.</i>	1137 <i>Alphaprot.</i>
122 <i>Acidob.</i>	239 <i>Actino.</i>	205 <i>Actino.</i>	560 <i>Bactero.</i>	133 <i>Acidob.</i>	1858 <i>Gammaprot.</i>	1396 <i>Betaprot.</i>
188 <i>Actino.</i>	484 <i>Bactero.</i>	329 <i>Actino.</i>	761 <i>Firmicutes</i>	1062 <i>Alphaprot.</i>	474 <i>Bactero.</i>	
242 <i>Actino.</i>	675 <i>Deinoc-Therm.</i>	360 <i>Actino.</i>	1122 <i>Alphaprot.</i>	118 <i>Acidob.</i>	738 <i>Firmicutes</i>	
346 <i>Actino.</i>	735 <i>Firmicutes</i>	391 <i>Actino.</i>	1321 <i>Betaprot.</i>	1127 <i>Alphaprot.</i>	1317 <i>Betaprot.</i>	
353 <i>Actino.</i>	1094 <i>Alphaprot.</i>	483 <i>Bactero.</i>	1401 <i>Betaprot.</i>	1144 <i>Alphaprot.</i>	179 <i>Actino.</i>	
427 <i>Actino.</i>	1126 <i>Alphaprot.</i>	792 <i>Firmicutes</i>	1366 <i>Betaprot.</i>	245 <i>Actino.</i>	513 <i>Bactero.</i>	
532 <i>Bactero.</i>	1279 <i>Alphaprot.</i>	796 <i>Firmicutes</i>		335 <i>Actino.</i>	1146 <i>Alphaprot.</i>	
663 <i>Chloroflexi</i>	1308 <i>Alphaprot.</i>	801 <i>Firmicutes</i>		1090 <i>Alphaprot.</i>	1161 <i>Alphaprot.</i>	
763 <i>Firmicutes</i>	1359 <i>Betaprot.</i>	1139 <i>Alphaprot.</i>		1310 <i>Alphaprot.</i>	1265 <i>Alphaprot.</i>	
1047 <i>Nitrosp.</i>	1382 <i>Betaprot.</i>	1807 <i>Gammaprot.</i>		1520 <i>Deltaprot.</i>	1287 <i>Alphaprot.</i>	
1057 <i>Planctom.</i>	1456 <i>Betaprot.</i>	877 <i>Firmicutes</i>		1526 <i>Deltaprot.</i>	1441 <i>Betaprot.</i>	
1151 <i>Alphaprot.</i>		154 <i>Actino.</i>		1853 <i>Gammaprot.</i>	1051 <i>Planctom.</i>	
1460 <i>Betaprot.</i>		1879 <i>Synergis.</i>			1541 <i>Deltaprot.</i>	
1524 <i>Deltaprot.</i>					1923 <i>Verrucomi.</i>	
1536 <i>Deltaprot.</i>						
1054 <i>Planctom.</i>						
LODO AEROBIO	258 <i>Actino.</i>	939 <i>Firmicutes</i>	868 <i>Firmicutes</i>	1298 <i>Alphaprot.</i>	895 <i>Firmicutes</i>	924 <i>Firmicutes</i>
	285 <i>Actino.</i>	1025 <i>Firmicutes</i>	882 <i>Firmicutes</i>	1361 <i>Betaprot.</i>	241 <i>Actino.</i>	934 <i>Firmicutes</i>
	338 <i>Actino.</i>	1089 <i>Alphaprot.</i>	893 <i>Firmicutes</i>	1367 <i>Betaprot.</i>	898 <i>Firmicutes</i>	890 <i>Firmicutes</i>
	458 <i>Bactero.</i>	721 <i>Firmicutes</i>	1132 <i>Alphaprot.</i>	1447 <i>Betaprot.</i>	469 <i>Bactero.</i>	1017 <i>Firmicutes</i>
	465 <i>Bactero.</i>	727 <i>Firmicutes</i>	1171 <i>Alphaprot.</i>	1697 <i>Gammaprot.</i>	452 <i>Bactero.</i>	705 <i>Firmicutes</i>
LODO ANAEROBIO	837 <i>Firmicutes</i>	543 <i>Bactero.</i>	919 <i>Firmicutes</i>	1557 <i>Deltaprot.</i>	1596 <i>Gammaprot.</i>	
	171 <i>Actino.</i>	270 <i>Actino.</i>	699 <i>Firmicutes</i>	1026 <i>Firmicutes</i>	1876 <i>Synergis.</i>	
	250 <i>Actino.</i>	456 <i>Bactero.</i>	870 <i>Firmicutes</i>	1142 <i>Alphaprot.</i>		
	259 <i>Actino.</i>	541 <i>Bactero.</i>	915 <i>Firmicutes</i>	1454 <i>Betaprot.</i>		

**Figura 50. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra incluyendo los lodos en los distintos muestreos y OTUs en cada muestra en el primer análisis (junio de 2007, T0) y en los lodos.** Se llevó a cabo con la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*. Solamente se muestran los árboles del agrupamiento jerárquico a partir de T1 con el objetivo de comprobar cómo evolucionan las muestras respecto de las muestras de lodo.

### 3.5.3.3 VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LAS MUESTRAS DE SUELO A LO LARGO DEL TIEMPO.

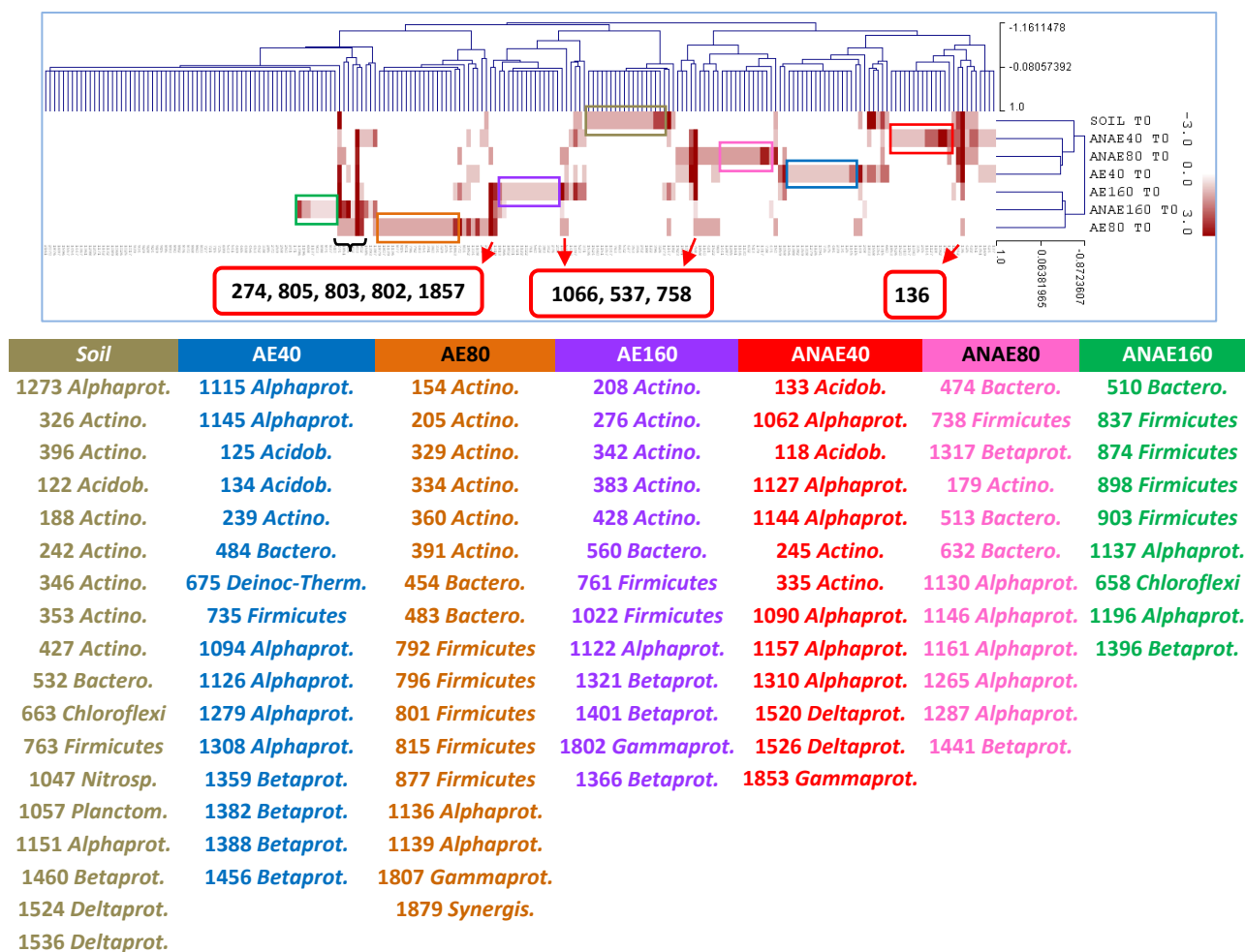
En el primer análisis (junio de 2007 – T0) la adición de lodos ocasionó una disminución importante en la proporción del filo *Acidobacteria* respecto al suelo sin tratar (*Soil*), puesto que cuanto mayor fue la dosis de lodo aplicada, menor fue su porcentaje llegando, incluso, a desaparecer en ANAE160 (Figura 51), al igual que el filo *Actinobacteria* aunque esa disminución no fue tan drástica. Además, las proporciones de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, y las clases *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* se incrementaron con las enmiendas de lodos, principalmente en aquellas con las mayores dosis (AE160 y ANAE160) respecto al suelo control (Figura 51). Por el contrario, la proporción de la clase *Alphaproteobacteria* disminuyó en las parcelas tratadas con la mayor dosis de lodo anaerobio (ANAE160), aumentando con las dosis bajas e intermedias de ese mismo lodo (Figura 51). La clase *Deltaproteobacteria* desapareció de las muestras tratadas con las mayores dosis. La muestra tratada con la mayor dosis de lodo anaerobio fue la que presentó las proporciones más alteradas en sus poblaciones bacterianas respecto al suelo control (*Soil*) (Figura 51).

El análisis realizado con *Greengenes* del análisis de junio de 2007 (T0) (Figura 52) revela que el agrupamiento jerárquico de las muestras fue similar al descrito en la Figura 50. Los OTUs comunes en la mayor parte de las muestras pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (274), *Bacteroidetes* (537), *Firmicutes* (758, 802, 805, 803) y a las clases *Alphaproteobacteria* (1066) y *Gammaproteobacteria* (1857) (flecha roja, Figura 52). El OTU 136 (*Acidobacteria*) fue detectado en todas las muestras, a excepción de ANAE160, mientras que los OTUs del filo *Firmicutes* se encuentran sobre todo en las muestras tratadas con lodos. Los OTUs que diferenciaron el suelo control de las otras muestras pertenecían en su mayoría a los filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (principalmente *Alpha* y *Delta*), mientras que las muestras tratadas con dosis bajas (AE40 y ANAE40) presentaron OTUs distintos pero de filos similares a los encontrados en el suelo control junto con una mayor proporción de secuencias de los filos *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria* y *Bacteroidetes* (Figura 52). En las muestras tratadas con dosis intermedias de lodos de depuradora (AE80 y ANAE80), los OTUs de los filos *Firmicutes* y *Actinobacteria* (sobre todo en AE80), *Bacteroidetes* y la clase *Alphaproteobacteria* (sobre todo en ANAE80) diferenciaron esas muestras de las otras. En AE160 los OTUs característicos pertenecían a los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta* y *Gamma*), mientras que en ANAE160 son escasos y pertenecen sobre todo a los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* (*Alpha* y *Beta*) (Figura 52).



Filos – T0	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
<b>Acidobacteria</b>	13,56	12,66	1,61	2,70	21,13	11,32	0,00
<b>Actinobacteria</b>	32,20	13,92	17,74	16,22	16,90	15,09	16,25
<b>Bacteroidetes</b>	3,39	2,53	4,84	6,76	1,41	7,55	2,50
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	1,69	2,53	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	1,69	13,92	35,48	20,27	11,27	18,87	36,25
<b>Gemmatimonadetes</b>	3,39	2,53	0,00	0,00	2,82	3,77	0,00
<b>Nitrospira</b>	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Planctomycetes</b>	3,39	3,80	0,00	1,35	0,00	3,77	0,00
<b>Proteobacteria</b>	38,98	40,51	37,10	50,00	45,07	35,85	42,50
<b>Alphaproteobacteria</b>	18,64	21,52	12,90	20,27	29,58	20,75	5,00
<b>Gammaproteobacteria</b>	6,78	6,33	16,13	20,27	5,63	5,66	22,50
<b>Betaproteobacteria</b>	1,69	7,59	6,45	9,46	7,04	5,66	15,00
<b>Deltaproteobacteria</b>	8,47	3,80	1,61	0,00	2,82	3,77	0,00
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	3,39	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Verrucomicrobia</b>	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00	1,89	0,00
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	1,61	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	0,00	6,33	1,61	2,70	1,41	1,89	0,00

**Figura 51. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en junio de 2007 (T0).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).



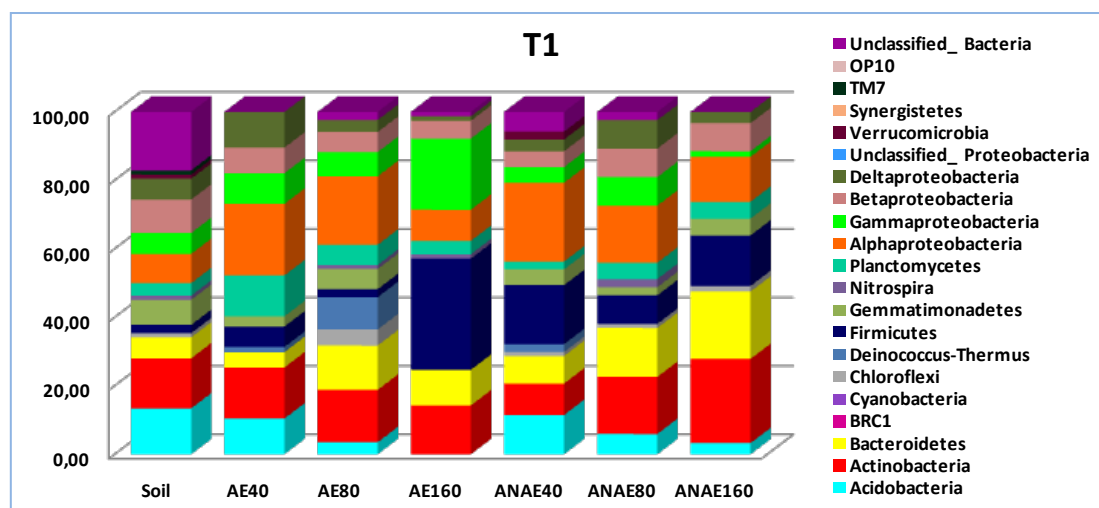
**Figura 52. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en junio de 2007 (T0).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

En el muestreo de octubre de 2007 (T1) sigue existiendo una clara alteración en la composición bacteriana de las parcelas tratadas con lodos respecto del suelo control. Así, hemos observado que la proporción del filo *Acidobacteria* siguió siendo menor en los suelos tratados con lodos respecto al suelo sin tratar, sobre todo con las dosis intermedias y altas, desapareciendo en AE160 (Figura 53). La proporción del filo *Actinobacteria* se mantuvo relativamente constante en casi todas las muestras, a excepción de un incremento en ANAE160, mientras que el número de secuencias pertenecientes al filo *Bacteroidetes* se incrementa en las muestras tratadas con lodos (Figura 53). La proporción del filo *Firmicutes* siguió siendo superior en líneas generales a la detectada en el suelo control, sobre todo en AE160 y en las muestras tratadas con lodo anaerobio, principalmente en ANAE40 y ANAE160 (Figura 53). Las muestras tratadas con lodos presentan una mayor proporción de la clase *Alphaproteobacteria*, a excepción de AE160 que presentó una proporción similar a la encontrada en el suelo sin tratar. La clase *Gammaproteobacteria* se incrementó sobre todo en AE160, disminuyendo en las tratadas con lodo anaerobio (Figura 53). La proporción de la clase *Deltaproteobacteria* disminuyó con el incremento de la dosis de lodo aplicada. Los porcentajes de las otras poblaciones bacterianas se mantuvieron relativamente

constantes en todas las muestras, a excepción de la presencia de un mayor porcentaje del filo *Deinococcus-Thermus* en AE80 (Figura 53).

El análisis realizado con *Greengenes* en octubre de 2007 (T1) muestra en el agrupamiento jerárquico que las poblaciones de las parcelas tratadas con mayores dosis (AE160 y ANAE160) se agrupan con las de las dosis intermedias (AE80 y ANAE80), mientras que la composición bacteriana del suelo control fue similar a la de las parcelas tratadas con dosis bajas de lodos (AE40 y ANAE40) (Figura 54). Los OTUs más frecuentes en gran parte de las muestras fueron similares a las detectadas en junio de 2007 (T0) (Figura 52) existiendo una mayor proporción de *Actinobacteria* (274, 295 y 428), *Alphaproteobacteria* (1097 y 1309) *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1057 y 1058) y *Betaproteobacteria* (1396 y 1460) (flecha roja, Figura 54). El suelo control se diferencia del resto de las muestras principalmente por los OTUs de los filos *Proteobacteria* (*Alpha* y *Delta*), *Acidobacteria* y *Actinobacteria*, mientras que las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias (AE40, ANAE40, AE80, ANAE80) se diferencian por estos mismos filos pero compuestos por OTUs distintos además de la presencia de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y las clases *Gamma*, *Delta* y *Betaproteobacteria*, principalmente en ANAE40. Las tratadas con las mayores dosis también se diferencian por la presencia de OTUs distintos de los mismos filos encontrados en las otras muestras, con la salvedad de que existe una mayor proporción de la clase *Gammaproteobacteria* en AE160 (Figura 54).

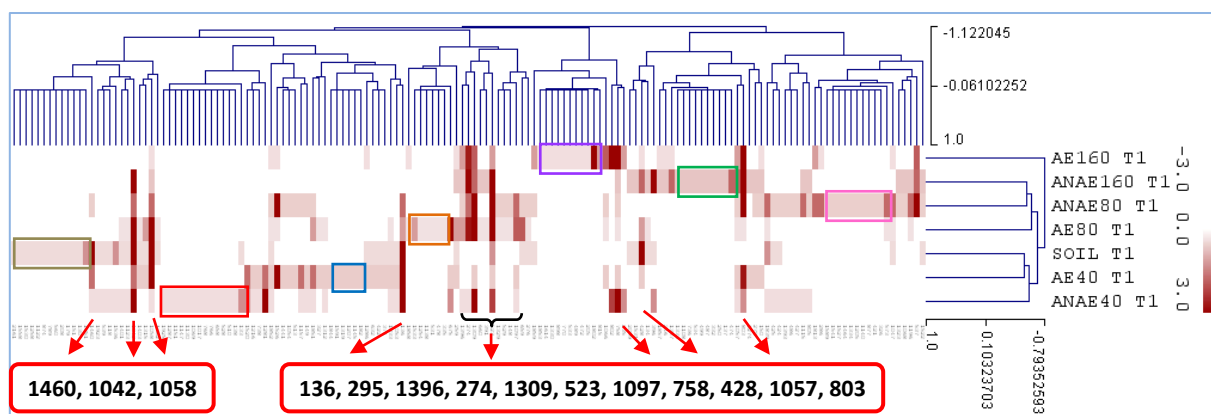




Filos – T1	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
<b>Acidobacteria</b>	13,41	10,45	3,53	0,00	11,49	5,95	3,28
<b>Actinobacteria</b>	14,63	14,93	15,29	14,29	9,20	16,67	24,59
<b>Bacteroidetes</b>	6,10	4,48	12,94	10,39	8,05	14,29	19,67
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	1,22	0,00	4,71	0,00	1,15	1,19	1,64
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	1,49	9,41	0,00	2,30	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	2,44	5,97	2,35	32,47	17,24	8,33	14,75
<b>Gemmatimonadetes</b>	7,32	2,99	5,88	0,00	4,60	2,38	4,92
<b>Nitrospira</b>	1,22	0,00	1,18	1,30	0,00	2,38	0,00
<b>Planctomycetes</b>	3,66	11,94	5,88	3,90	2,30	4,76	4,92
<b>Proteobacteria</b>	30,49	47,76	36,47	36,36	35,63	41,67	26,23
<b>Alphaproteobacteria</b>	8,54	20,90	20,00	9,09	22,99	16,67	13,11
<b>Gammaproteobacteria</b>	6,10	8,96	7,06	20,78	4,60	8,33	1,64
<b>Betaproteobacteria</b>	9,76	7,46	5,88	5,19	4,60	8,33	8,20
<b>Deltaproteobacteria</b>	6,10	10,45	3,53	1,30	3,45	8,33	3,28
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Verrucomicrobia</b>	1,22	0,00	0,00	0,00	2,30	0,00	0,00
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	1,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	17,07	0,00	2,35	1,30	5,75	2,38	0,00

**Figura 53. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en octubre de 2007 (T1).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).

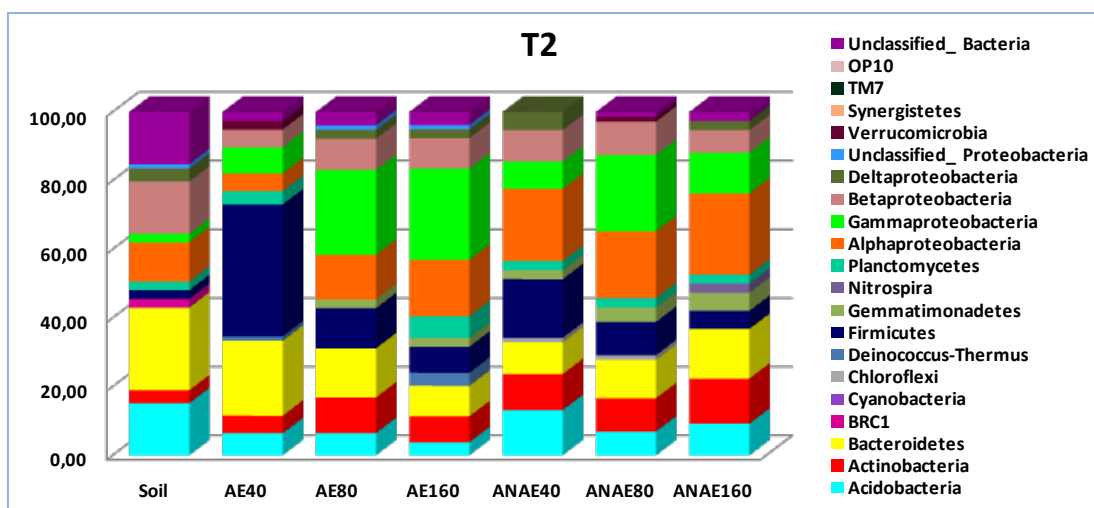




Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
1351 <i>Betaprot.</i>	182 <i>Actino.</i>	335 <i>Actino.</i>	815 <i>Firmicutes</i>	138 <i>Acidob.</i>	326 <i>Actino.</i>	474 <i>Bactero.</i>
130 <i>Acidob.</i>	1145 <i>Alphaprot.</i>	478 <i>Bactero.</i>	1802 <i>Gammaprot.</i>	510 <i>Bactero.</i>	421 <i>Actino.</i>	137 <i>Acidob.</i>
151 <i>Actino.</i>	1207 <i>Alphaprot.</i>	531 <i>Bactero.</i>	205 <i>Actino.</i>	528 <i>Bactero.</i>	877 <i>Firmicutes</i>	250 <i>Actino.</i>
179 <i>Actino.</i>	1319 <i>Betaprot.</i>	1138 <i>Alphaprot.</i>	472 <i>Bactero.</i>	658 <i>Chloroflexi</i>	1140 <i>Alphaprot.</i>	332 <i>Actino.</i>
208 <i>Actino.</i>	1591 <i>Gammaprot.</i>	1254 <i>Alphaprot.</i>	489 <i>Bactero.</i>	766 <i>Firmicutes</i>	1205 <i>Alphaprot.</i>	487 <i>Bactero.</i>
560 <i>Bactero.</i>	1844 <i>Gammaprot.</i>	1533 <i>Deltaprot.</i>	533 <i>Bactero.</i>	768 <i>Firmicutes</i>	1334 <i>Betaprot.</i>	499 <i>Bactero.</i>
789 <i>Firmicutes</i>		1858 <i>Gammaprot.</i>	770 <i>Firmicutes</i>	1017 <i>Firmicutes</i>	1464 <i>Deltaprot.</i>	534 <i>Bactero.</i>
874 <i>Firmicutes</i>			898 <i>Firmicutes</i>	1069 <i>Alphaprot.</i>	1527 <i>Deltaprot.</i>	736 <i>Firmicutes</i>
1122 <i>Alphaprot.</i>			1330 <i>Betaprot.</i>	1130 <i>Alphaprot.</i>	1541 <i>Deltaprot.</i>	1108 <i>Alphaprot.</i>
1258 <i>Alphaprot.</i>			1614 <i>Gammaprot.</i>	1147 <i>Alphaprot.</i>	1589 <i>Gammaprot.</i>	1333 <i>Betaprot.</i>
1530 <i>Deltaprot.</i>			1853 <i>Gammaprot.</i>	1151 <i>Alphaprot.</i>		
1558 <i>Deltaprot.</i>				1287 <i>Alphaprot.</i>		
2161 <i>TM7</i>				1925 <i>Verrucomic.</i>		

**Figura 54. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en octubre de 2007 (T1).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

En febrero de 2008 (T2) hemos detectado que las proporciones más alteradas corresponden a los filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y dentro de *Proteobacteria*, a las clases *Gamma*, *Alpha* y *Betaproteobacteria*. El filo *Acidobacteria* se encontró en menor proporción principalmente en aquellas muestras tratadas con lodo aerobio respecto al suelo control, sobre todo en AE160 (Figura 55). Además, hemos detectado un incremento en los porcentajes de *Bacteroidetes* en todas las muestras, existiendo una mayor proporción en el suelo control. La proporción del filo *Firmicutes* aumentó en todas las muestras tratadas con lodos con respecto al suelo control pero principalmente en las parcelas tratadas con menores dosis (AE40) (Figura 55). Excepto en AE40, todas las parcelas con lodo presentaron un mayor porcentaje de secuencias del filo *Proteobacteria* que el suelo control. En concreto, ese incremento se manifiesta en las clases *Alpha* y *Gammaproteobacteria*. Por el contrario, el porcentaje del filo *Betaproteobacteria* disminuyó en las parcelas tratadas. No hemos detectado la clase *Deltaproteobacteria* en AE40 y ANAE80 (Figura 55).

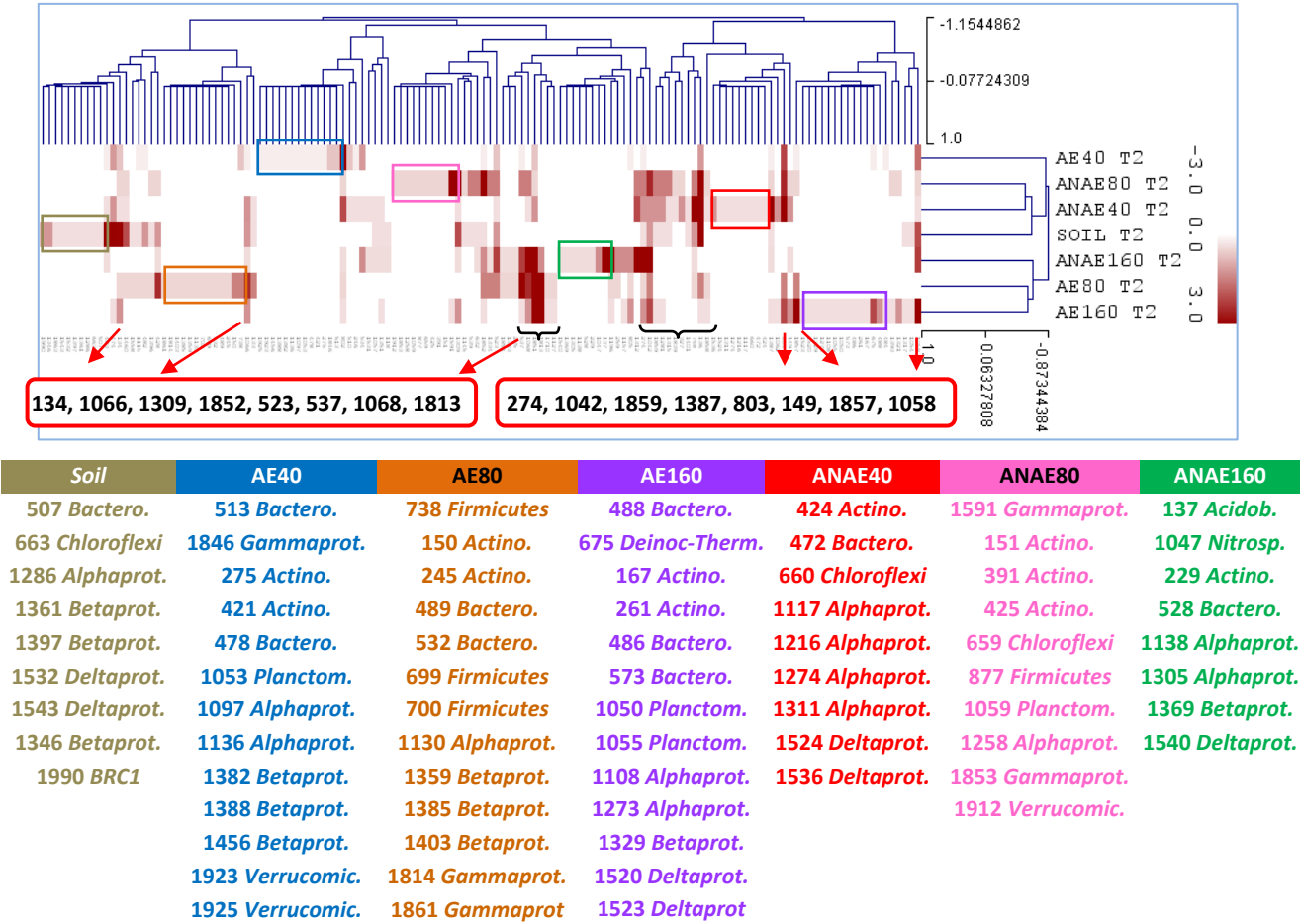


Filos – T2	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
<b>Acidobacteria</b>	15,19	6,41	6,49	3,80	13,16	6,94	9,21
<b>Actinobacteria</b>	3,80	5,13	10,39	7,59	10,53	9,72	13,16
<b>Bacteroidetes</b>	24,05	21,79	14,29	8,86	9,21	11,11	14,47
<b>BRC1</b>	2,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32	1,39	0,00
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	1,28	0,00	3,80	0,00	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	2,53	38,46	11,69	7,59	17,11	9,72	5,26
<b>Gemmatimonadetes</b>	0,00	0,00	2,60	2,53	2,63	4,17	5,26
<b>Nitrospira</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63
<b>Planctomycetes</b>	2,53	3,85	0,00	6,33	2,63	2,78	2,63
<b>Proteobacteria</b>	34,18	17,95	50,65	55,70	43,42	51,39	44,74
<b>Alphaproteobacteria</b>	11,39	5,13	12,99	16,46	21,05	19,44	23,68
<b>Gammaproteobacteria</b>	2,53	7,69	24,68	26,58	7,89	22,22	11,84
<b>Betaproteobacteria</b>	15,19	5,13	9,09	8,86	9,21	9,72	6,58
<b>Deltaproteobacteria</b>	3,80	0,00	2,60	2,53	5,26	0,00	2,63
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	1,27	0,00	1,30	1,27	0,00	0,00	0,00
<b>Verrucomicrobia</b>	0,00	2,56	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	15,19	2,56	3,90	3,80	0,00	1,39	2,63

**Figura 55. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en febrero de 2008 (T2).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).

Los OTUs más comunes entre las distintas muestras en febrero de 2008 (T2) pertenecen a los filos *Acidobacteria* (134), *Actinobacteria* (149 y 274), *Bacteroidetes* (523 y 537), *Firmicutes* (803), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1058) y a las clases *Alpha* (1066, 1068 y 1309), *Beta* (1387) y *Gammaproteobacteria* (1813, 1852, 1857 y 1859) (flecha roja, Figura 56). En el agrupamiento jerárquico, la composición

bacteriana del suelo control fue similar al de las muestras tratadas con las menores dosis (AE40 y ANAE40) y a ANAE80, mientras que las tratadas con mayores dosis (AE160 y ANAE160) se agruparon con AE80. Nuevamente, aparecen diferencias en la composición de OTUs en cada una de las muestras. En el suelo control los OTUs característicos pertenecen sobre todo al filo *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta* y *Delta*), mientras que en otras muestras además de este filo, existen otros OTUs característicos en los filos *Actinobacteria* y *Firmicutes* (AE80 y ANAE80), *Bacteroidetes* y *Planctomycetes* (AE160 y ANAE80), *Verrucomicrobia* (AE40 y ANAE80) y la clase *Gammaproteobacteria*. El mayor número de OTUs diferentes se encuentra en los suelos tratados con lodos aerobios (Figura 56).



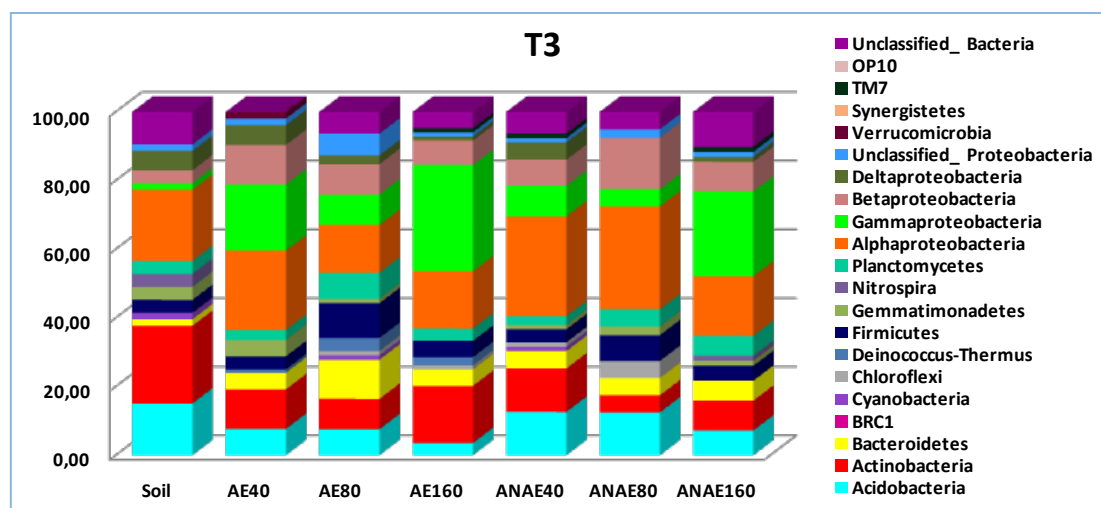
**Figura 56. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en febrero de 2008 (T2).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

Al igual que los muestreos anteriores, en junio de 2008 (T3) el filo *Acidobacteria* se encuentra en menor proporción en las muestras tratadas con lodo aerobio (AE160) respecto al suelo sin tratar (Figura 57). La proporción del filo *Actinobacteria* se redujo en las parcelas tratadas con dosis intermedias y altas de lodo anaerobio. Por el contrario, los porcentajes de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* se mantuvieron relativamente similares a excepción de una mayor proporción en AE80 (Figura 57). En el caso del filo *Proteobacteria* también hemos observado un incremento

en las parcelas tratadas, de manera similar al anterior muestreo, puesto que se detectó un aumento en la proporción de secuencias de las clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Sin embargo, en este caso, también se incrementó la proporción de la clase *Betaproteobacteria*. Mientras que las dosis bajas e intermedias de lodo aumentaron el número de secuencias de los filos *Alpha* y *Betaproteobacteria*, fue en las dosis altas de lodo donde se incrementó el de *Gammaproteobacteria* (Figura 57).

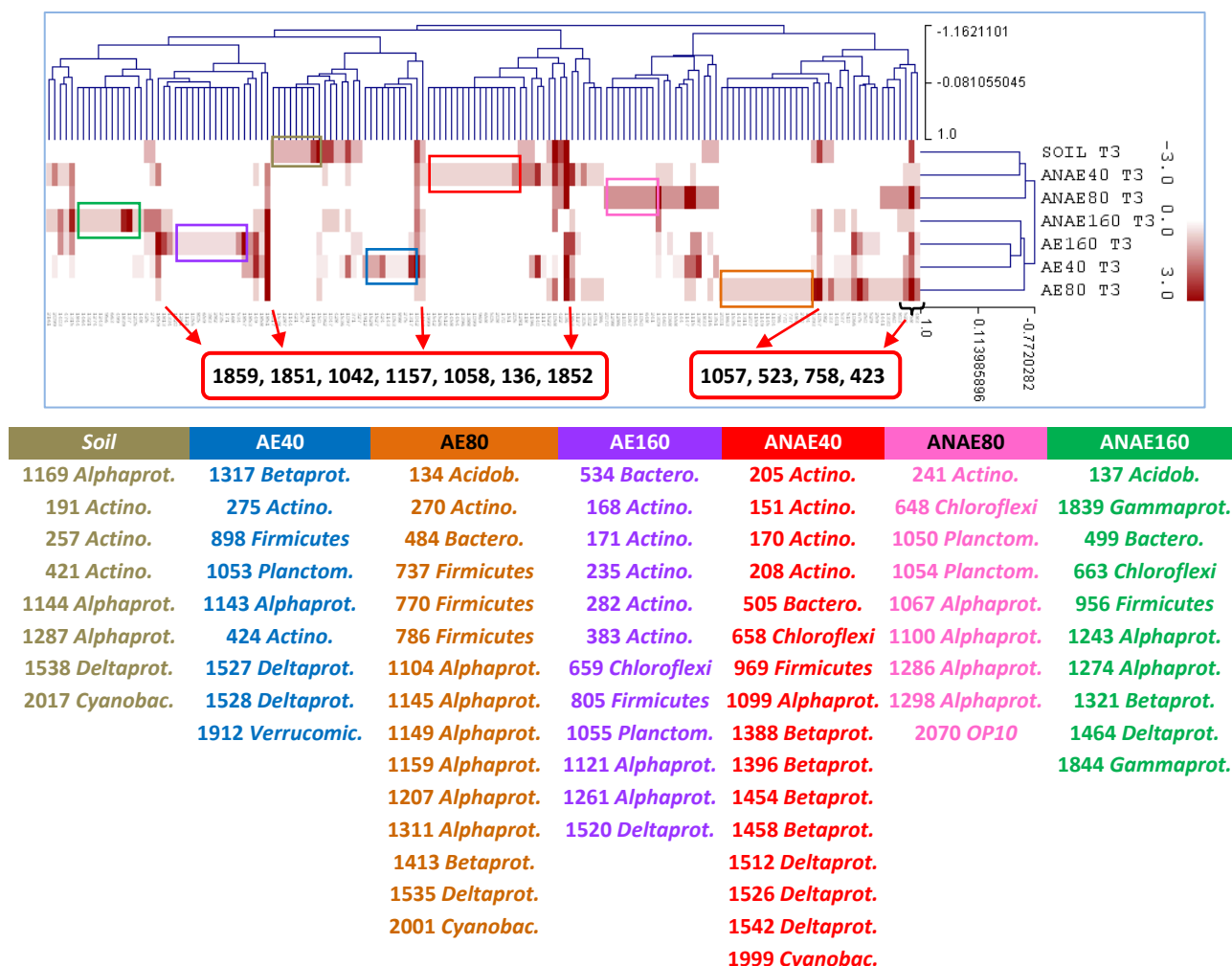
En junio de 2008 (T3), la clasificación realizada por *Greengenes* muestra que los OTUs más frecuentes en la mayoría de las muestras pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (423), *Bacteroidetes* (523), *Firmicutes* (758), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1057 y 1058) y las clases *Alpha* (1157) y *Gammaproteobacteria* (1851, 1852 y 1859) (flecha roja, Figura 58). En el agrupamiento jerárquico, la composición bacteriana del suelo control sigue siendo similar a la de ANAE40 y ANAE80, mientras que las tratadas con mayores dosis se agrupan con AE80 y AE40 (Figura 58). Las muestras más distintas fueron AE80, AE160, y ANAE40, puesto que presentan una mayor cantidad de OTUs principalmente de los filos *Actinobacteria* (AE160 y ANAE40), *Firmicutes* (AE80) y de las clases *Alpha* (AE80), *Beta* y *Deltaproteobacteria* (ANAE40). El suelo control se distinguió de las otras muestras por la presencia de OTUs de los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (*Alpha* y *Delta*), mientras que AE40 se diferenció por estos filos y además por los filos *Verrucomicrobia* y *Firmicutes*. La muestra ANAE80 presenta una mayor proporción de *Alphaproteobacteria* y la presencia de *Planctomycetes*, así como una menor proporción de *Actinobacteria*. En cuanto a ANAE160, el filo *Proteobacteria* fue el que más distinguió esa muestra de las otras principalmente (Figura 58).

En octubre de 2008 (T4), todavía la proporción de secuencias del filo *Acidobacteria* fue menor en las parcelas tratadas, desapareciendo incluso totalmente en AE160, mientras que se detecta un incremento del filo *Actinobacteria* en algunas de las parcelas (AE160 y ANAE40) (Figura 59). La proporción de la clase *Alphaproteobacteria* se incrementó en las muestras tratadas respecto al suelo control, a excepción de un menor porcentaje en AE160. Hemos observado una mayor proporción de la clase *Gammaproteobacteria* en las muestras tratadas con lodos siendo menos acusada en ANAE40 (Figura 59). No hemos detectado secuencias de la clase *Deltaproteobacteria* en las muestras tratadas con lodo aerobio y en ANAE160. El porcentaje del resto de los filos bacterianos se mantuvo relativamente similar en casi todas las muestras (Figura 59).



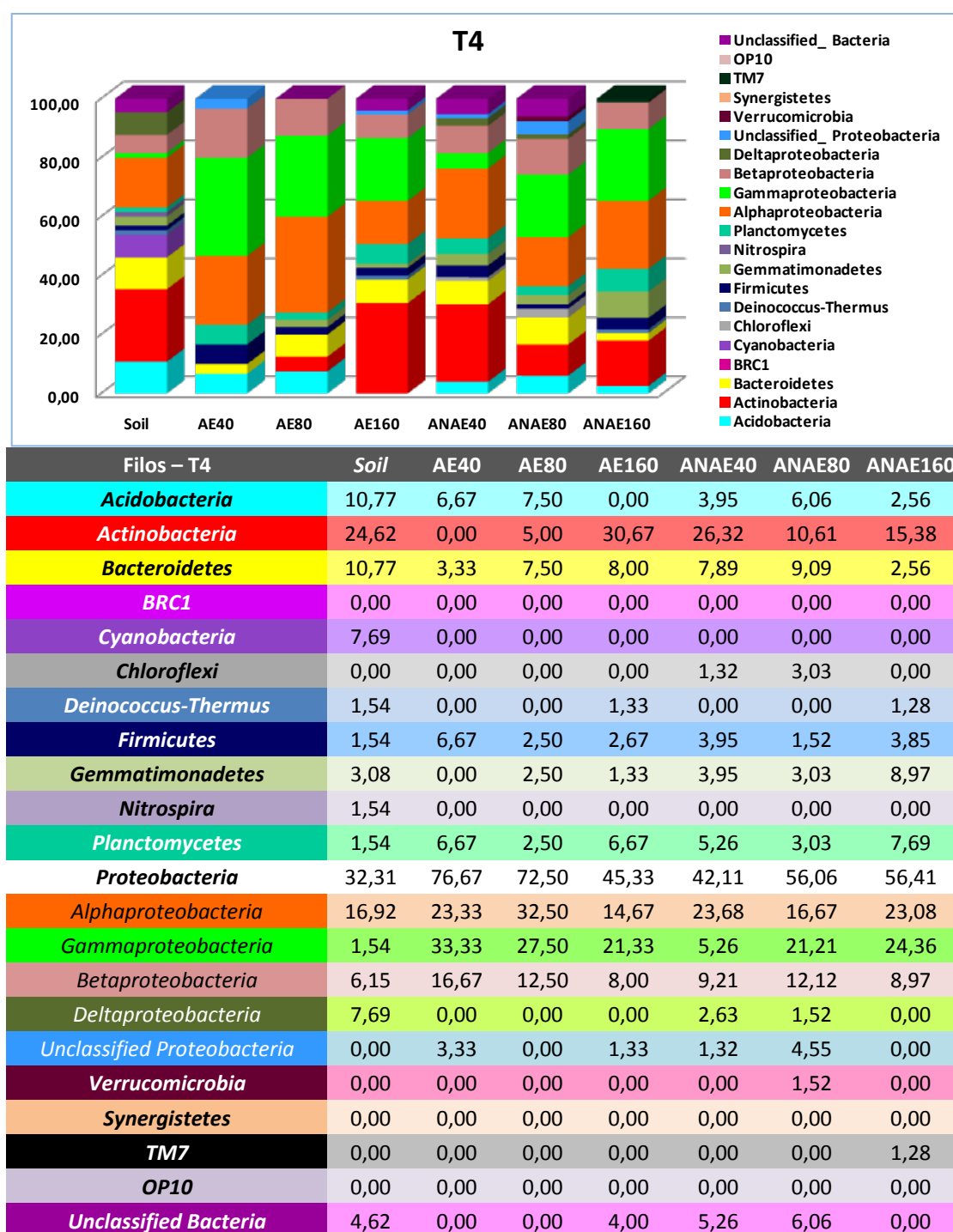
Filos – T3	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
<b>Acidobacteria</b>	15,09	7,69	7,59	3,57	12,66	12,50	7,25
<b>Actinobacteria</b>	22,64	11,54	8,86	16,67	12,66	5,00	8,70
<b>Bacteroidetes</b>	1,89	4,81	11,39	4,76	5,06	5,00	5,80
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	1,89	0,00	1,27	0,00	1,27	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	0,00	0,00	1,27	1,19	1,27	5,00	0,00
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	0,96	3,80	2,38	0,00	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	3,77	3,85	10,13	4,76	3,80	7,50	4,35
<b>Gemmatimonadetes</b>	3,77	4,81	1,27	0,00	1,27	2,50	1,45
<b>Nitrospira</b>	3,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45
<b>Planctomycetes</b>	3,77	2,88	7,59	3,57	2,53	5,00	5,80
<b>Proteobacteria</b>	33,96	61,54	40,51	57,14	51,90	52,50	53,62
<b>Alphaproteobacteria</b>	20,75	23,08	13,92	16,67	29,11	30,00	17,39
<b>Gammaproteobacteria</b>	1,89	19,23	8,86	30,95	8,86	5,00	24,64
<b>Betaproteobacteria</b>	3,77	11,54	8,86	7,14	7,59	15,00	8,70
<b>Deltaproteobacteria</b>	5,66	5,77	2,53	1,19	5,06	0,00	1,45
<b>Unclassified Proteobacteria</b>	1,89	1,92	6,33	1,19	1,27	2,50	1,45
<b>Verrucomicrobia</b>	0,00	1,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	1,19	1,27	0,00	1,45
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	9,43	0,00	6,33	4,76	6,33	5,00	10,14

**Figura 57. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en junio de 2008 (T3).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).



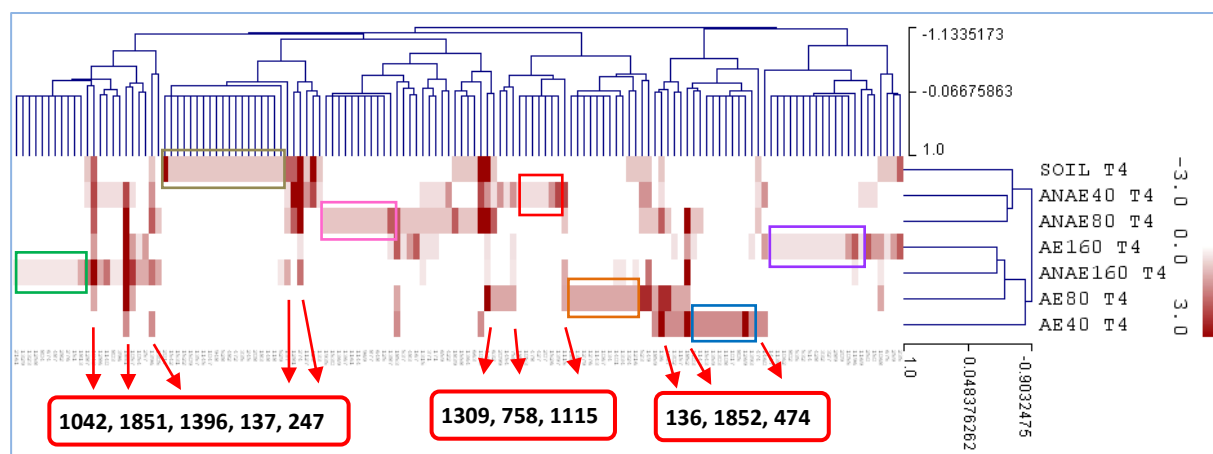
**Figura 58. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en junio de 2008 (T3).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

En el agrupamiento jerárquico de las muestras de octubre de 2008 (T4) (Figura 60), éstas se distribuyen de manera muy similar al análisis anterior (T3) (Figura 58) a excepción de que en T4, AE40 es la muestra más distinta respecto del suelo control. Algunos de estos OTUs se encuentran en casi todas las muestras y pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136 y 137), *Actinobacteria* (274), *Bacteroidetes* (474), *Firmicutes* (758), *Gemmatimonadetes* (1042) y a las clases *Alpha* (1115 y 1309), *Gamma* (1851 y 1852) y *Betaproteobacteria* (1396) (flecha roja, Figura 60). En el suelo control algunos OTUs de los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (*Delta* y *Beta*) diferencian esa muestra, mientras que en AE40 y en AE80 los OTUs del filo *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*) son los que las distinguen de las demás. En la muestra AE160 existe una mayor proporción del filo *Actinobacteria* y de las clases *Alpha* y *Betaproteobacteria* que la diferencia de las otras, mientras que en el caso de ANAE40 se trata de una menor proporción del filo *Proteobacteria* (*Beta* y *Delta*). En ANAE80 y ANAE160 son distintas del resto de las muestras principalmente por los OTUs del filo *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*), además de los filos *Firmicutes* (en ANAE80) y *Actinobacteria* (en ANAE160) (Figura 60).



**Figura 59. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en octubre de 2008 (T4).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).





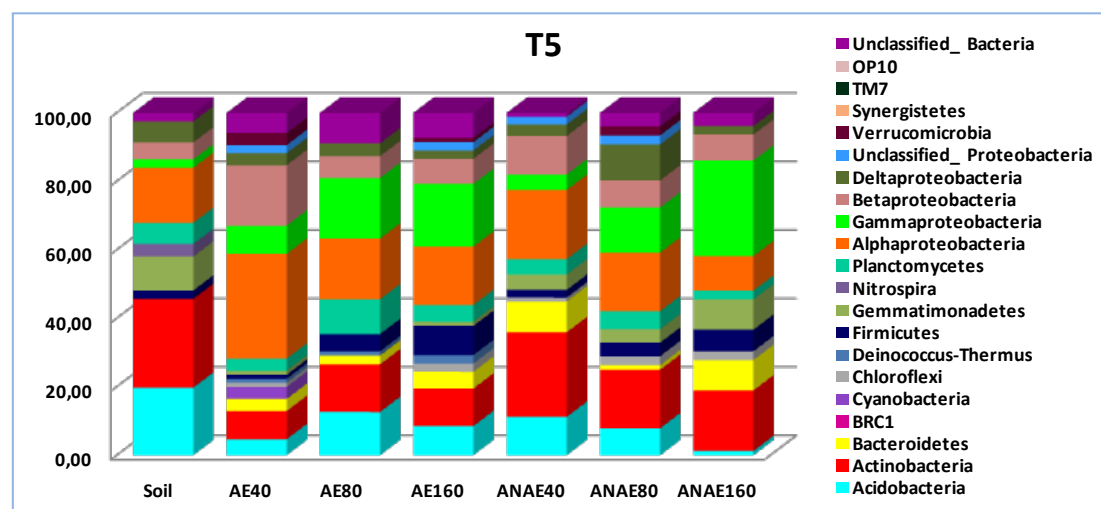
Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
529 <i>Bactero.</i>	1393 <i>Betaprot.</i>	1216 <i>Alphaprot.</i>	1169 <i>Alphaprot.</i>	1397 <i>Betaprot.</i>	1387 <i>Betaprot.</i>	1813 <i>Gammaprot.</i>
118 <i>Acidob.</i>	1269 <i>Alphaprot.</i>	1324 <i>Betaprot.</i>	1196 <i>Alphaprot.</i>	1526 <i>Deltaprot.</i>	125 <i>Acidob.</i>	151 <i>Actino.</i>
148 <i>Actino.</i>	805 <i>Firmicutes</i>	1334 <i>Betaprot.</i>	1055 <i>Planctom.</i>	207 <i>Actino.</i>	648 <i>Chloroflexi</i>	276 <i>Actino.</i>
183 <i>Actino.</i>	1017 <i>Firmicutes</i>	1401 <i>Betaprot.</i>	209 <i>Actino.</i>	427 <i>Actino.</i>	877 <i>Firmicutes</i>	282 <i>Actino.</i>
208 <i>Actino.</i>	1108 <i>Alphaprot.</i>	134 <i>Acidob.</i>	289 <i>Actino.</i>	478 <i>Bactero.</i>	969 <i>Firmicutes</i>	487 <i>Bactero.</i>
245 <i>Actino.</i>	1303 <i>Alphaprot.</i>	1067 <i>Alphaprot.</i>	327 <i>Actino.</i>	1053 <i>Planctom.</i>	1144 <i>Alphaprot.</i>	674 <i>Deinoc-Therm.</i>
335 <i>Actino.</i>	1359 <i>Betaprot.</i>	1143 <i>Alphaprot.</i>	332 <i>Actino.</i>	1854 <i>Gammaprot.</i>	1161 <i>Alphaprot.</i>	804 <i>Firmicutes</i>
472 <i>Bactero.</i>	1543 <i>Deltaprot.</i>	1276 <i>Alphaprot.</i>	428 <i>Actino.</i>		1367 <i>Betaprot.</i>	1258 <i>Alphaprot.</i>
482 <i>Bactero.</i>	1147 <i>Alphaprot.</i>	1279 <i>Alphaprot.</i>	514 <i>Bactero.</i>		1369 <i>Betaprot.</i>	1323 <i>Betaprot.</i>
528 <i>Bactero.</i>	1403 <i>Betaprot.</i>	1351 <i>Betaprot.</i>	532 <i>Bactero.</i>		1530 <i>Deltaprot.</i>	1329 <i>Betaprot.</i>
948 <i>Firmicutes</i>		1858 <i>Gammaprot.</i>	535 <i>Bactero.</i>		1935 <i>Verrucomic.</i>	2161 <i>TM7</i>
1047 <i>Nitrosp.</i>			802 <i>Firmicutes</i>			
1145 <i>Alphaprot.</i>			1062 <i>Alphaprot.</i>			
1357 <i>Betaprot.</i>			1138 <i>Alphaprot.</i>			
1509 <i>Deltaprot.</i>			1447 <i>Betaprot.</i>			
1522 <i>Deltaprot.</i>						
1531 <i>Deltaprot.</i>						
1542 <i>Deltaprot.</i>						
2017 <i>Cyanobac.</i>						

**Figura 60. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en octubre de 2008 (T4).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

En el penúltimo muestreo de nuestro estudio (febrero de 2009 – T5), hemos observado que las proporciones de los filos bacterianos en las muestras tratadas con las menores dosis de lodo empiezan a asemejarse a las del suelo sin tratar (Figura 61). La proporción del filo *Acidobacteria* siguió siendo menor en las muestras tratadas con lodos, llegando a disminuir en aproximadamente un 90 % en ANAE160 respecto al suelo control (Figura 61). Hemos detectado una menor proporción del filo *Actinobacteria* en las parcelas tratadas con lodo aerobio y un incremento del filo *Firmicutes* en AE80 y AE160 (Figura 61). Se puede observar un incremento gradual de la proporción de secuencias de la clase *Gammaproteobacteria* conforme se incrementan las dosis de lodo (AE160 y ANAE160) (Figura 61). La clase *Alphaproteobacteria* presentó proporciones muy similares en todas las muestras excepto en AE40 donde se incrementa (Figura 61), mientras que existió una disminución en el porcentaje de secuencias de *Deltaproteobacteria*, excepto en AE80



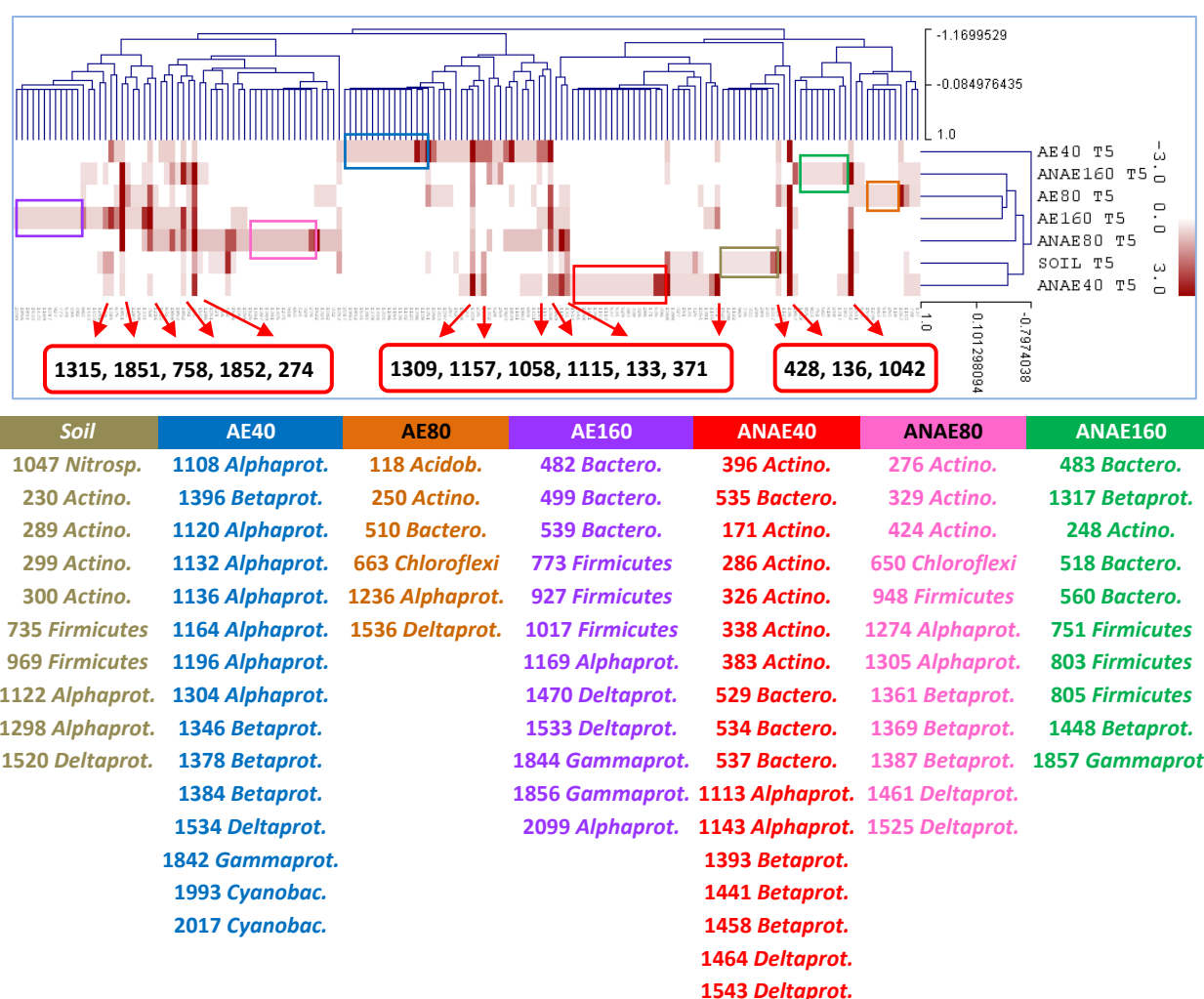
donde aumentó. Al igual que en el muestreo anterior, la proporción del filo *Gemmatimonadetes* fue mayor en las muestras tratadas con lodo anaerobio que en las de lodo aerobio, pero ambas menores que las presentes en el suelo control (Figura 61).



Filos – T5	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
<b>Acidobacteria</b>	19,75	4,71	12,66	8,54	11,24	7,89	1,27
<b>Actinobacteria</b>	25,93	8,24	13,92	10,98	24,72	17,11	17,72
<b>Bacteroidetes</b>	0,00	3,53	2,53	4,88	8,99	1,32	8,86
<b>BRC1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Cyanobacteria</b>	0,00	3,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Chloroflexi</b>	0,00	1,18	0,00	2,44	1,12	2,63	2,53
<b>Deinococcus-Thermus</b>	0,00	1,18	1,27	2,44	0,00	0,00	0,00
<b>Firmicutes</b>	2,47	1,18	5,06	8,54	2,25	3,95	6,33
<b>Gemmatimonadetes</b>	9,88	1,18	0,00	1,22	4,49	3,95	8,86
<b>Nitrospira</b>	3,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Planctomycetes</b>	6,17	3,53	10,13	4,88	4,49	5,26	2,53
<b>Proteobacteria</b>	29,63	62,35	45,57	47,56	41,57	51,32	48,10
<i>Alphaproteobacteria</i>	16,05	30,59	17,72	17,07	20,22	17,11	10,13
<i>Gammaproteobacteria</i>	2,47	8,24	17,72	18,29	4,49	13,16	27,85
<i>Betaproteobacteria</i>	4,94	17,65	6,33	7,32	11,24	7,89	7,59
<i>Deltaproteobacteria</i>	6,17	3,53	3,80	2,44	3,37	10,53	2,53
<i>Unclassified Proteobacteria</i>	0,00	2,35	0,00	2,44	2,25	2,63	0,00
<b>Verrucomicrobia</b>	0,00	3,53	0,00	1,22	0,00	2,63	0,00
<b>Synergistetes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TM7</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>OP10</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Unclassified Bacteria</b>	2,47	5,88	8,86	7,32	1,12	3,95	3,80

**Figura 61. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en febrero de 2009 (T5).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole et al., 2007).

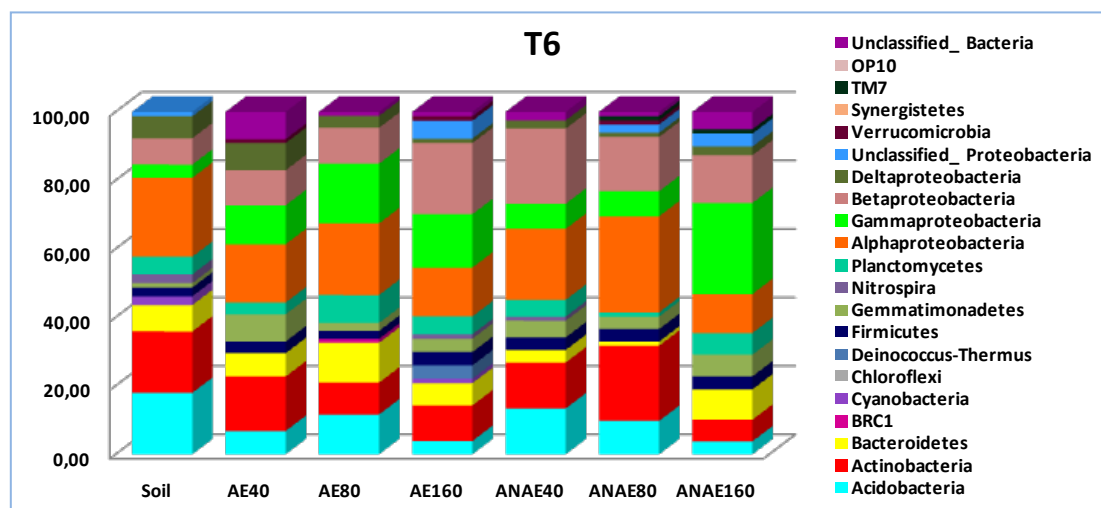
En el agrupamiento jerárquico de las muestras de febrero de 2009 (T5), AE40 presenta la composición bacteriana más distinta del resto. En ese caso, las poblaciones del suelo control fueron similares a las de ANAE40, mientras que las muestras tratadas con mayores dosis fueron más parecidas a ANAE80 y AE80 (Figura 62). Los OTUs más frecuentes fueron similares a los observados en el muestreo anterior (T4), existiendo una mayor número de secuencias de la clase *Alphaproteobacteria* (1157, 1309 y 1315) y del filo *Actinobacteria* (274, 371 y 428) (flecha roja, Figura 62). Las muestras tratadas con lodos se diferencian del suelo control por la presencia de OTUs que pertenecen principalmente a los filos *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*), *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que el suelo control se distingue de las otras muestras por la presencia de una menor proporción de OTUs de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (*Alpha*) (Figura 62).



**Figura 62. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en febrero de 2009 (T5).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

En el último muestreo de nuestro estudio (junio de 2009 – T6), la proporción del filo *Acidobacteria* continuó siendo menor en las parcelas enmendadas, especialmente en las de mayor cantidad de lodo, al igual que en el caso del filo

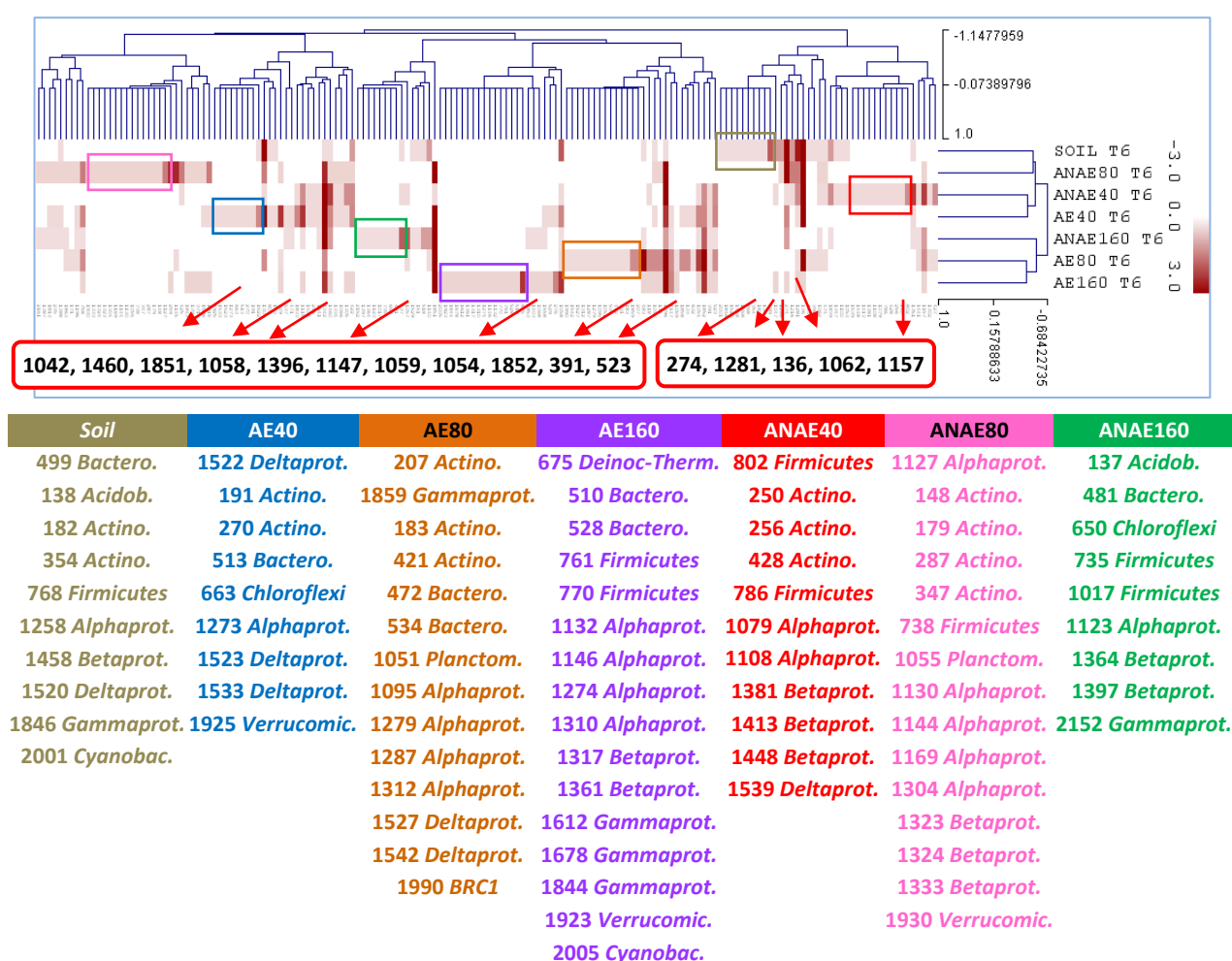
*Actinobacteria* (Figura 63). También hemos detectado un incremento importante del porcentaje de las clases *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* en las muestras tratadas con lodo, junto con menores porcentajes de las clases *Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* en las muestras tratadas con las mayores dosis de lodo, sobre todo en ANAE160 (Figura 63).



Filos – T6	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
<i>Acidobacteria</i>	17,95	6,82	11,63	3,90	13,41	9,76	3,80
<i>Actinobacteria</i>	17,95	15,91	9,30	10,39	13,41	21,95	6,33
<i>Bacteroidetes</i>	7,69	6,82	11,63	6,49	3,66	1,22	8,86
<i>BRC1</i>	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cyanobacteria</i>	2,56	0,00	0,00	1,30	0,00	0,00	0,00
<i>Chloroflexi</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,00	0,00	0,00	3,90	0,00	0,00	0,00
<i>Firmicutes</i>	2,56	3,41	2,33	3,90	3,66	3,66	3,80
<i>Gemmatimonadetes</i>	1,28	7,95	2,33	3,90	4,88	3,66	6,33
<i>Nitrospira</i>	2,56	0,00	0,00	1,30	1,22	0,00	0,00
<i>Planctomycetes</i>	5,13	3,41	8,14	5,19	4,88	1,22	6,33
<i>Proteobacteria</i>	42,31	46,59	52,33	57,14	52,44	54,88	58,23
<i>Alphaproteobacteria</i>	23,08	17,05	20,93	14,29	20,73	28,05	11,39
<i>Gammaproteobacteria</i>	3,85	11,36	17,44	15,58	7,32	7,32	26,58
<i>Betaproteobacteria</i>	7,69	10,23	10,47	20,78	21,95	15,85	13,92
<i>Deltaproteobacteria</i>	6,41	7,95	3,49	1,30	2,44	1,22	2,53
<i>Unclassified Proteobacteria</i>	1,28	0,00	0,00	5,19	0,00	2,44	3,80
<i>Verrucomicrobia</i>	0,00	1,14	0,00	1,30	0,00	1,22	0,00
<i>Synergistetes</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>TM7</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22	1,27
<i>OP10</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Unclassified Bacteria</i>	0,00	7,95	1,16	1,30	2,44	1,22	5,06

**Figura 63. Composición de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras en junio de 2009 (T6).** Porcentaje respecto al número total de secuencias en cada muestra. Datos procesados utilizando el programa *Classifier* de la base de datos *Ribosomal Database Project v10* (RDP10) al 80 % de similitud (Cole *et al.*, 2007).

En el agrupamiento jerárquico de las muestras del último análisis (junio de 2009, T6), las parcelas tratadas con mayor dosis se agrupan entre sí y junto con AE80. Este grupo sigue siendo el más distinto respecto del suelo control al igual que en T5 (Figura 62), mientras que las tratadas con menores dosis (AE40 y ANAE40) fueron similares entre sí (Figura 64). Los OTUs más frecuentes en ese análisis pertenecen a los filos *Acidobacteria* (136), *Actinobacteria* (274 y 391), *Bacteroidetes* (523), *Gemmatimonadetes* (1042), *Planctomycetes* (1054, 1058 y 1059) y a las clases *Alpha* (1147, 1157 y 1281), *Beta* (1396 y 1460) y *Gammaproteobacteria* (1851 y 1852) (flecha roja, Figura 64). Las muestras tratadas con lodos, sobre todo AE40, AE80 y AE160, se diferencian del suelo control por una mayor proporción de OTUs pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Delta* y *Gamma*), *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. El suelo control se diferenció de esas muestras por la presencia de OTUs de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y la clase *Alphaproteobacteria* (aunque en una menor proporción comparada a las otras muestras) (Figura 64).



**Figura 64. Comparaciones entre los OTUs presentes en cada muestra en junio de 2009 (T6).** Se llevó a cabo con los datos procedentes de *Classify* de *Greengenes* utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*.

### 3.5.3.4 COMPARACIONES ENTRE LAS PROPORCIONES DE LOS GRUPOS BACTERIANOS MÁS CARACTERÍSTICOS DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO.

Con el fin de detectar las diferencias existentes entre las poblaciones bacterianas presentes en las muestras del estudio hemos realizado comparaciones entre las genotecas de cada muestra de suelo con el programa *LibCompare* de RDP (*Ribosomal Data Project v10*) (Wang *et al.*, 2007). Al igual que otros autores (Janssen, 2006), hemos seleccionado los filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, por tratarse de los más frecuentes en las muestras (Tabla 29 a Tabla 34).

Entre las muestras de suelo control (*Soil*) y las tratadas con las dosis bajas e intermedias de lodo aerobio (AE40 y AE80) hemos observado disminuciones significativas del número de secuencias de los filos *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) en los primeros muestreos – T0 y T1 (AE80) y en los últimos – T5 y T6 (AE40), *Actinobacteria* – clase *Actinobacteria* (siendo más considerable en AE40) y del filo *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, género *Flavisolibacter* en AE80 – febrero de 2008 – T2) (Tabla 29). Se detectan además, incrementos importantes en las muestras tratadas de la proporción de los filos *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Planococcus* y *Planomicrobium*) en los primeros muestreos del estudio y *Proteobacteria* (clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, género *Luteimonas*) (Tabla 29). La mayor proporción de la clase *Gammaproteobacteria* (género *Luteimonas*) en AE80 fue observada incluso hasta el último análisis (junio de 2009 – T6) (Tabla 29).

Las dosis bajas e intermedias de lodo anaerobio (ANAE40 y ANAE80) añadidas al suelo produjeron alteraciones similares a las producidas con dosis similares de lodo aerobio. Se detectan en las muestras tratadas disminuciones de los filos *Acidobacteria* (género *Gp6*) (T5) y *Actinobacteria* - clase *Actinobacteria* (T0 y T3) exclusivamente en ANAE80, y de *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, género *Flavisolibacter*) (Tabla 29). El filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Bacillus* y *Planomicrobium*) se incrementó en los primeros muestreos en las muestras tratadas (Tabla 29). En cuanto al filo *Proteobacteria*, hemos observado un incremento de la proporción de las clases *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* (género *Luteimonas*) y *Deltaproteobacteria* en esas muestras respecto a *Soil* (Tabla 29).

Las diferencias más significativas se encuentran en las comparaciones entre el suelo control (*Soil*) y las muestras tratadas con mayores dosis de lodo aerobio y anaerobio (AE160 y ANAE160). En las muestras tratadas existe una disminución del filo *Acidobacteria* (género *Gp6*) que se mantuvo hasta el último análisis del estudio en junio de 2009 – T6 (sobre todo en AE160), y del filo *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*) en algunos muestreos (T0, T2 y T3) (Tabla 29), como ya hemos comentado anteriormente en los otros resultados. En cuanto al filo *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, género *Flavisolibacter*) hemos observado una menor proporción en AE160, y un incremento seguido de una disminución en ANAE160, respecto al suelo control (Tabla 29). La presencia del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Bacillus*, *Planococcus* y *Planomicrobium*) se incrementó en los primeros análisis (T0 y T1) al igual que las bacterias del filo *Proteobacteria* (especialmente la

clase *Gammaproteobacteria*, género *Luteimonas*, incluso dos años después de la aplicación de los lodos) en las parcelas tratadas. La mayoría de las alteraciones en la composición microbiana del suelo por la utilización de dosis de lodo tan elevadas fueron detectadas incluso 2 años después de la aplicación (Tabla 29).

Además, hemos detectado diferencias significativas en las proporciones de las poblaciones bacterianas entre las propias muestras tratadas con lodos de depuradora. En la comparación entre las genotecas de AE40 y ANAE40 hemos observado una disminución de la proporción del filo *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*) en T4 y T5, y un incremento de *Firmicutes* (clase *Bacilli*, género *Planococcus*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*) en T2 y de la clase *Gammaproteobacteria* (género *Lysobacter*) en T4 (Tabla 30). Además, se produce un incremento del porcentaje del filo *Proteobacteria* (de la clase *Alphaproteobacteria*, género *Inquilinus*) en ANAE40 respecto a AE40 en T2 y T4 (Tabla 30).

En las comparaciones entre AE40 con AE80 y ANAE80, las diferencias más importantes se manifiestan en el incremento de los filos *Firmicutes* (clase *Bacilli*, género *Planococcus*) y *Proteobacteria* (especialmente la clase *Gammaproteobacteria*, género *Luteimonas* en AE80) en AE80 y ANAE80, y una disminución de *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) entre AE40 y AE80 (en octubre de 2007 – T1) (Tabla 30). Las diferencias más significativas están en las comparaciones entre las genotecas de AE40 con AE160 y ANAE160, en las cuales en estas últimas hemos observado en algunos análisis una disminución más acusada de los filos *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*), y una variación (incremento y descenso) del porcentaje de *Proteobacteria* en AE160 y ANAE160 respecto a AE40 (incremento de la clase *Gammaproteobacteria* – géneros *Luteimonas*, *Lysobacter* y *Stenotrophomonas*, y de la clase *Betaproteobacteria*; disminución de la clase *Alphaproteobacteria* – género *Inquilinus*) (Tabla 30).

En la comparación entre AE80 y ANAE40, hemos detectado una disminución en la proporción de los filos *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) en T0, *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*, género *Arthrobacter*) en T4 y de la clase *Alphaproteobacteria* en T0 y T3; y un incremento del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*) en T3, y de la clase *Gammaproteobacteria* (género *Luteimonas*) en los muestreos T4, T5 y T6 en AE80 respecto a ANAE40 (Tabla 31). Entre AE80 y AE160 las principales diferencias residen en la proporción del filo *Proteobacteria* (incremento de la clase *Gammaproteobacteria* - género *Luteimonas*, junto con una disminución de *Alphaproteobacteria* en AE160 respecto a AE80) (Tabla 31).

Entre AE80 y ANE80 las diferencias significativas se manifiestan en una menor proporción de los filos *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*) (T6), y de la clase *Alphaproteobacteria* (T3) en AE80, y una menor proporción de *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*) (T6). En cambio, existe una mayor proporción del filo *Firmicutes* (T0) y de la clase *Gammaproteobacteria* (T6).

Entre AE80 y ANAE160, las diferencias se encuentran en una mayor proporción de los filos *Acidobacteria* en AE80 (T5), *Proteobacteria* (clases *Alphaproteobacteria* en T3, *Gammaproteobacteria*, T2 y T3) y *Firmicutes* (T1).

En la muestra tratada con la mayor dosis de lodo aerobio (AE160), además de las diferencias ya descritas, hemos observado que aún existen diferencias en la

comparación con ANAE40 puesto que se detecta un menor porcentaje de los filos *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) y *Actinobacteria*, y de la clase *Alphaproteobacteria*; un incremento de la clase *Gammaproteobacteria* (géneros *Luteimonas* y *Stenotrophomonas*) y del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*) (Tabla 32). Las diferencias entre AE160 y ANAE80 se resumen principalmente en la disminución en la proporción de las bacterias del filo *Acidobacteria* y de la clase *Alphaproteobacteria* y un incremento de la clase *Gammaproteobacteria* (géneros *Luteimonas* y *Stenotrophomonas*) en AE160, frente a un incremento de la clase *Deltaproteobacteria* y una disminución del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, género *Planococcus*) en ANAE80 (Tabla 32). Entre AE160 y ANAE160 las principales diferencias se reflejan en la proporción de la clase *Gammaproteobacteria* (géneros *Stenotrophomonas*, *Luteimonas* y *Lysobacter*) en algunos muestreos (T1, T2, T4, T5 y T6) y del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Planococcus* y *Planomicrobium*), y una mayor proporción del filo *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria* - T4) y de la clase *Alphaproteobacteria* (T0) en AE160 (Tabla 32).

En ANAE40 y ANAE80 hemos apreciado diferencias importantes en las comparaciones con ANAE160. Las principales fueron la menor proporción de los filos *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) y *Proteobacteria* (clase *Alphaproteobacteria*), frente a un incremento de la clase *Gammaproteobacteria* (géneros *Luteimonas* y *Lysobacter*) en ANAE160 (Tabla 33 y Tabla 34).





**Tabla 29. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes de Soil y las muestras tratadas con lodo aerobio y anaerobio.** Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de RDP10 (Wang *et al.*, 2007). No hay diferencias entre Soil y ANAE80 en el T6. Los números entre paréntesis indican el número de secuencias del grupo bacteriano identificado en cada una de las genotecas de las muestras. Las diferencias estadísticas significativas son: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . Se muestran filas vacías en algunas de las tablas a continuación porque en alguna de las comparaciones realizadas entre las muestras existe alguna diferencia.



**Tabla 30. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes de AE40 y el resto de las muestras tratadas con lodo aerobio y anaerobio.** Se llevó a cabo como se describe en la Tabla 29. No hay diferencias entre AE40 y ANAE40, ANAE80 (T0); AE40 y ANAE40 (T3); AE40 y AE80 (T4), AE40 y AE80, AE160 (T6).

FILO	CLASE	GÉNERO	AE80-AE160	AE80-ANAE40	AE80-ANAE80	AE80-ANAE160
<b>Acidobacteria</b>			T4 (3/0*)	T0 (1/15***)		T5 (10/1**)
	<b>Acidobacteria - Gp6</b>			T0 (1/9*)		
		<b>Gp6</b>		T0 (1/9*)		
<b>Actinobacteria</b>			T4 (2/23**)	T4 (2/21**)	T6 (8/19*)	
	<b>Actinobacteria</b>		T4 (2/23**)	T4 (2/21**)	T6 (8/19*)	
		<b>Arthrobacter</b>		T4 (0/8*)		
<b>Bacteroidetes</b>					T6 (10/1**)	
	<b>Sphingobacteria</b>			T5 (0/7*)	T6 (10/1**)	
		<b>Flavisolibacter</b>				
<b>Firmicutes</b>			T0 (22/15*) T1 (2/25**)	T0 (22/8***) T1 (2/14**) T3 (8/1*)	T0 (22/10*)	T1 (2/9**)
	<b>Bacilli</b>		T1 (2/24**)	T0 (19/8**) T1 (2/14**) T3 (8/1*)		T1 (2/9**)
		<b>Bacillus</b>				
		<b>Planococcus</b>	T1 (0/7**)			
		<b>Planomicrobium</b>	T1 (1/7*)			T1 (1/6*)
<b>Proteobacteria</b>			T3 (32/48*) T4 (29/34**)	T4 (29/32**)		
	<b>α-proteobacteria</b>		T4 (13/11*)	T0 (8/21*) T3 (11/23*)	T3 (11/12*)	
		<b>Rhizobium</b>				
		<b>Inquilinus</b>				
		<b>Sphingomonas</b>				T4 (3/0*)
	<b>β-proteobacteria</b>		T6 (8/16*)	T6 (8/18*)		
		<b>Massilia</b>				
	<b>γ-proteobacteria</b>		T1 (6/16**) T3 (7/27***)	T2 (19/6**) T4 (11/4**) T5 (14/5*) T6 (15/6*)	T6 (15/6*)	T2 (19/9*) T3 (7/16*)
		<b>Luteimonas</b>	T3 (4/14*)	T4 (6/1**) T5 (12/3*) T6 (7/1*)	T5 (13/3*)	
		<b>Lysobacter</b>				
		<b>Stenotrophomonas</b>				
	<b>δ-proteobacteria</b>					

**Tabla 31. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes de AE80 y el resto de las muestras tratadas con lodo aerobio y anaerobio. Se llevó a cabo con el programa LibCompare de RDP10. No hay diferencias entre AE80 y ANAE80 (T4); AE80 y AE160 (T5); AE80 y ANAE160 (T6).**

FILO	CLASE	GÉNERO	AE160-ANAE40	AE160-ANAE80	AE160-ANAE160
<b>Acidobacteria</b>			T0 (2/15***) T1 (0/10**) T2 (3/10*) T3 (3/10*) T6 (3/11*)	T1 (0/5*) T4 (0/4*)	
		<b>Acidobacteria - Gp6</b>	T0 (2/9*) T1 (0/6*) T2 (1/8*) T6 (1/9*)		
		<b>Gp6</b>	T0 (2/9*) T1 (0/6*) T2 (1/8*)		
<b>Actinobacteria</b>			T5 (9/22*)	T4 (23/8*) T6 (8/19*)	T4 (23/12*)
		<b>Actinobacteria</b>	T5 (9/22*)	T4 (23/8*) T6 (8/19*)	T4 (23/12*)
		<b>Arthrobacter</b>			
<b>Bacteroidetes</b>					
		<b>Sphingobacteria</b>			
		<b>Flavisolibacter</b>			
<b>Firmicutes</b>			T1 (25/15*)	T1 (25/7***)	T0 (15/29*) T1 (25/9*)
		<b>Bacilli</b>	T1 (24/14*)	T1 (24/6***)	T1 (24/9*)
		<b>Bacillus</b>			
		<b>Planococcus</b>		T1 (7/1*)	T1 (7/0*)
		<b>Planomicrobium</b>			T0 (6/17*)
<b>Proteobacteria</b>					
		<b>α-proteobacteria</b>	T1 (7/20*)	T6 (11/24*)	T0 (15/4**)
		<b>Rhizobium</b>			
		<b>Inquilinus</b>			
		<b>Sphingomonas</b>			
		<b>β-proteobacteria</b>			
		<b>Massilia</b>			
		<b>γ-proteobacteria</b>	T0 (15/4*) T1 (16/4**) T2 (21/6**) T3 (26/7***) T4 (16/4**) T5 (15/5*)	T0 (15/3*) T1 (16/7*) T3 (26/2**)	T1 (16/1***) T2 (21/9*)
		<b>Luteimonas</b>	T3 (13/3*) T4 (11/1**)	T3 (12/0*)	T5 (6/15*) T6 (4/14*)
		<b>Lysobacter</b>			T4 (0/5*)
		<b>Stenotrophomonas</b>	T0 (10/0**) T2 (6/0*)	T0 (10/1*) T2 (6/0*)	T2 (6/0*)
		<b>δ-proteobacteria</b>		T5 (2/8*)	

**Tabla 32. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes de AE160 y el resto de las muestras tratadas con lodo anaerobio. Se llevó a cabo con el programa LibCompare de RDP10.**

FILO	CLASE	GÉNERO	ANAE40-ANAE80	ANAE40-ANAE160
<b>Acidobacteria</b>				T0 (15/0***) T5 (10/1*) T6 (11/3*)
	<b>Acidobacteria - Gp6</b>			T0 (9/0***)
		<b>Gp6</b>		T0 (9/0***)
<b>Actinobacteria</b>			T4 (21/8*)	T1 (8/15*)
	<b>Actinobacteria</b>		T4 (21/8*)	T1 (8/15*)
		<b>Arthrobacter</b>		
<b>Bacteroidetes</b>			T5 (8/1*)	T1 (7/12*)
	<b>Sphingobacteria</b>			T1 (6/12*)
		<b>Flavisolibacter</b>		
<b>Firmicutes</b>				T0 (8/29***) T2 (13/4*)
	<b>Bacilli</b>			T0 (8/24***) T2 (13/4*)
		<b>Bacillus</b>		
		<b>Planococcus</b>		
		<b>Planomicrobium</b>		
<b>Proteobacteria</b>				
	<b>α-proteobacteria</b>			T0 (21/4***)
		<b>Rhizobium</b>		
		<b>Inquilinus</b>		
		<b>Sphingomonas</b>		
	<b>β-proteobacteria</b>			
		<b>Massilia</b>		
	<b>γ-proteobacteria</b>		T2 (6/16*) T4 (4/12*)	T0 (4/18**) T3 (7/17**) T4 (4/19**) T5 (5/22***) T6 (6/21***)
		<b>Luteimonas</b>		T4 (1/11**) T5 (3/14**) T6 (1/14***)
		<b>Lysobacter</b>		T4 (0/5*)
		<b>Stenotrophomonas</b>		
	<b>δ-proteobacteria</b>			

**Tabla 33. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes de ANAE40 y el resto de las muestras tratadas con lodo anaerobio. Se llevó a cabo con el programa LibCompare de RDP10.**

FILO	CLASE	GÉNERO	ANAE80-ANAE160
<b>Acidobacteria</b>			T0 (6/0**)
	<b>Acidobacteria - Gp6</b>		T0 (6/0**)
		<b>Gp6</b>	T0 (6/0**)
<b>Actinobacteria</b>			T6 (19/5**)
	<b>Actinobacteria</b>		T6 (19/5**)
		<b>Arthrobacter</b>	
<b>Bacteroidetes</b>			T5 (1/7*) T6 (1/7*)
	<b>Sphingobacteria</b>		T6 (1/7*)
		<b>Flavisolibacter</b>	
<b>Firmicutes</b>			T0 (10/29*)
	<b>Bacilli</b>		
		<b>Bacillus</b>	
		<b>Planococcus</b>	
		<b>Planomicrobium</b>	
<b>Proteobacteria</b>			
	<b>α-proteobacteria</b>		T0 (11/4**) T6 (23/9**)
		<b>Rhizobium</b>	
		<b>Inquilinus</b>	
		<b>Sphingomonas</b>	
	<b>β-proteobacteria</b>		
		<b>Massilia</b>	
	<b>γ-proteobacteria</b>		T0 (3/18*) T3 (2/17*) T5 (10/22*) T6 (6/21***)
		<b>Luteimonas</b>	T5 (2/14**) T6 (4/13*)
		<b>Lysobacter</b>	
		<b>Stenotrophomonas</b>	
	<b>δ-proteobacteria</b>		

**Tabla 34. Comparaciones entre las poblaciones microbianas más abundantes de ANAE80 y el resto de las muestras tratadas con lodo anaerobio. Se llevó a cabo con el programa LibCompare de RDP10.**

### 3.5.3.5 COMPARACIONES ENTRE LAS PROPORCIONES DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS MENOS ABUNDANTES Y RARAS DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO.

También hemos realizado comparaciones entre las proporciones de los filos bacterianos menos abundantes y raros presentes en las muestras de nuestro estudio. Los filos bacterianos raros han sido definidos por otros autores como aquellos grupos bacterianos que comprenden una muy pequeña proporción del total, representando, por tanto, una minoría en la comunidad bacteriana del suelo (Ashby *et al.*, 2007; Elshahed *et al.*, 2008). En nuestro estudio, hemos observado que las diferencias más significativas se manifestaron principalmente en los filos *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* (Tabla 35 a Tabla 38).

Entre el suelo control (*Soil*) y las muestras tratadas con lodos de depuradora, hemos observado que las diferencias se manifiestan sobre todo en la proporción de los filos *Cyanobacteria* (clase *Cyanobacteria*) en octubre de 2008 – T4 (entre *Soil* y AE160, y las muestras tratadas con lodo anaerobio), *Deinococcus-Thermus* (clase *Deinococci*, género *Truepera*) en octubre de 2007 – T1 (entre *Soil* y AE80) y *Gemmatimonadetes* (clase *Gemmatimonadetes*, género *Gemmatimonas*) en octubre de 2007 – T1 y en febrero de 2009 – T5 (entre *Soil* y las muestras tratadas con lodo aerobio) (Tabla 35).

En cuanto a la comparación entre AE40 y las otras muestras hemos detectado diferencias significativas en la proporción de los filos *Chloroflexi* en junio de 2008 – T3 (entre AE40 y ANAE80), *Gemmatimonadetes* (clase *Gemmatimonadetes*, género *Gemmatimonas*) en febrero de 2009 – T5 (entre AE40 y ANAE160) y, por último, *Planctomycetes* (clase *Planctomycetacia*) en octubre de 2007 – T1 (entre ANAE40 y AE40) (Tabla 36).

Respecto a la muestra AE80, hemos observado diferencias significativas principalmente en la menor proporción del filo *Deinococcus-Thermus* (clase *Deinococci*, género *Truepera*) en AE160, ANAE80 y ANAE160 en octubre de 2007 – T1. Hemos detectado además, diferencias entre AE80 y ANAE160 en la proporción del filo *Gemmatimonadetes* (clase *Gemmatimonadetes*, género *Gemmatimonas*) en febrero de 2009 - T5 y entre AE80 y AE160 en octubre de 2007 - T1. En cuanto al filo *Planctomycetes* (clase *Planctomycetacia*) las diferencias más importantes se encuentran entre AE80 y AE160 en febrero de 2008 (T2), entre AE80 y ANAE40 en febrero de 2009 - T5 (género *Singulisphaera*) y entre AE80 y ANAE80 en junio de 2009 (T6) (Tabla 37).

Las diferencias significativas respecto a la muestra tratada con mayor dosis de lodo aerobio (AE160) y las otras parcelas se reflejan en la mayor proporción del filo *Gemmatimonadetes* (clase *Gemmatimonadetes*, género *Gemmatimonas*) en octubre de 2008 - T4 y febrero de 2009 - T5 en ANAE160 (Tabla 38). No se observaron diferencias respecto a los filos raros entre las muestras ANAE40 y ANAE80.



**Tabla 35. Comparaciones entre los filos bacterianos menos abundantes y raros de *Soil* y el resto de las muestras tratadas con lodo aerobio y anaerobio. Se llevó a cabo como se describe en la Tabla 29.**

**Tabla 36. Comparaciones entre los filos bacterianos menos abundantes y raros de AE40 y el resto de las muestras tratadas con lodo aerobio y anaerobio. Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*.**

FILO	CLASE	GÉNERO	AE80-AE160	AE80-ANAE40	AE80-ANAE80	AE80-ANAE160
<i>Chloroflexi</i>						
	<i>Chloroflexi</i>					
<i>Cyanobacteria</i>						
	<i>Cyanobacteria</i>					
<i>Deinococcus-Thermus</i>			T1 (8/0**)		T1 ( 8/0**)	T1 ( 8/0**)
	<i>Deinococci</i>		T1 (8/0**)		T1 ( 8/0**)	T1 ( 8/0**)
		<i>Truepera</i>	T1 (8/0**)		T1 ( 8/0**)	T1 ( 8/0**)
<i>Gemmatimonadetes</i>			T1 (5/0*)			T5 (0/7**)
	<i>Gemmatimonadetes</i>		T1 (5/0*)			T5 (0/7**)
		<i>Gemmatimonas</i>	T1 (5/0*)			T5 (0/7**)
<i>Planctomycetes</i>			T2 (0/5*)		T6 (7/1*)	
	<i>Planctomycetacia</i>		T2 (0/5*)		T6 (7/1*)	
		<i>Singulisphaera</i>		T5 (4/0*)		

**Tabla 37. Comparaciones entre los filos bacterianos menos abundantes y raros de AE80 y las otras muestras tratadas con lodo aerobio y anaerobio. Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*.**

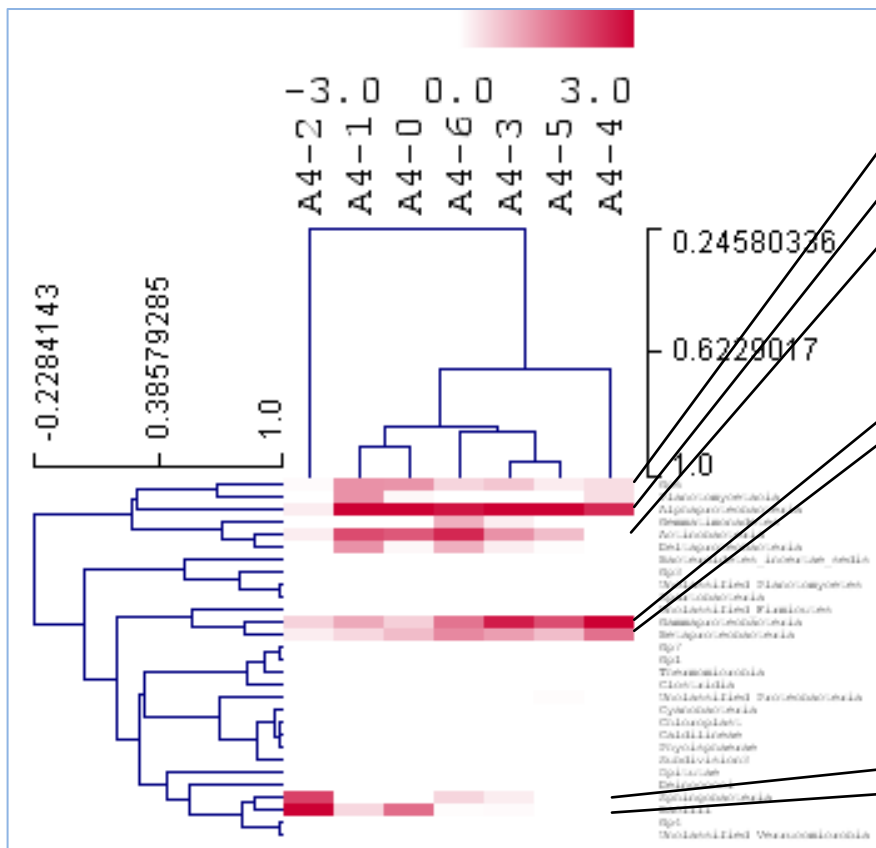
FILO	CLASE	GÉNERO	AE160-ANAE40	AE160-ANAE80	AE160-ANAE160
<i>Chloroflexi</i>					
	<i>Chloroflexi</i>				
<i>Cyanobacteria</i>					
	<i>Cyanobacteria</i>				
<i>Deinococcus-Thermus</i>					
	<i>Deinococci</i>				
		<i>Truepera</i>			
<i>Gemmatimonadetes</i>					T4 (1/7*) T5 (1/7*)
	<i>Gemmatimonadetes</i>				T4 (1/7*) T5 (1/7*)
		<i>Gemmatimonas</i>			T4 (1/7*) T5 (1/7*)
<i>Planctomycetes</i>					
	<i>Planctomycetacia</i>				
		<i>Singulisphaera</i>			

**Tabla 38. Comparaciones entre los filos bacterianos menos abundantes y raros de AE160 y las muestras tratadas con lodo anaerobio. Se llevó a cabo con el programa *LibCompare* de *RDP10*.**

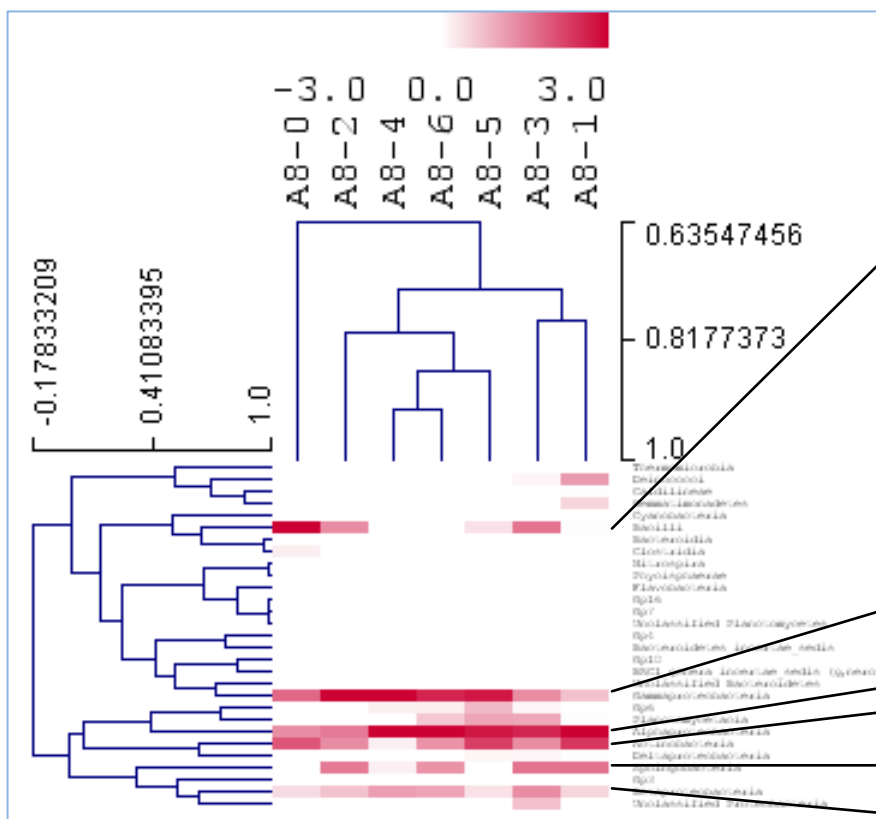
### 3.5.3.6 DIFERENCIAS ENTRE LAS CLASES BACTERIANAS DE LAS MUESTRAS.

Si bien el análisis realizado mediante la cuantificación del número de secuencias pertenecientes a diversos filos bacterianos nos proporciona un nivel de detalle razonable para poder distinguir si los suelos han sufrido algún tipo de alteración, el análisis realizado con la identificación de OTUs específicos es quizá demasiado detallado como para ser utilizado de una manera rápida y sencilla para comprobar esas alteraciones. ¿Es posible encontrar algún nivel filogenético susceptible de ser utilizado para identificar más rápidamente la presencia de alteraciones específicas?

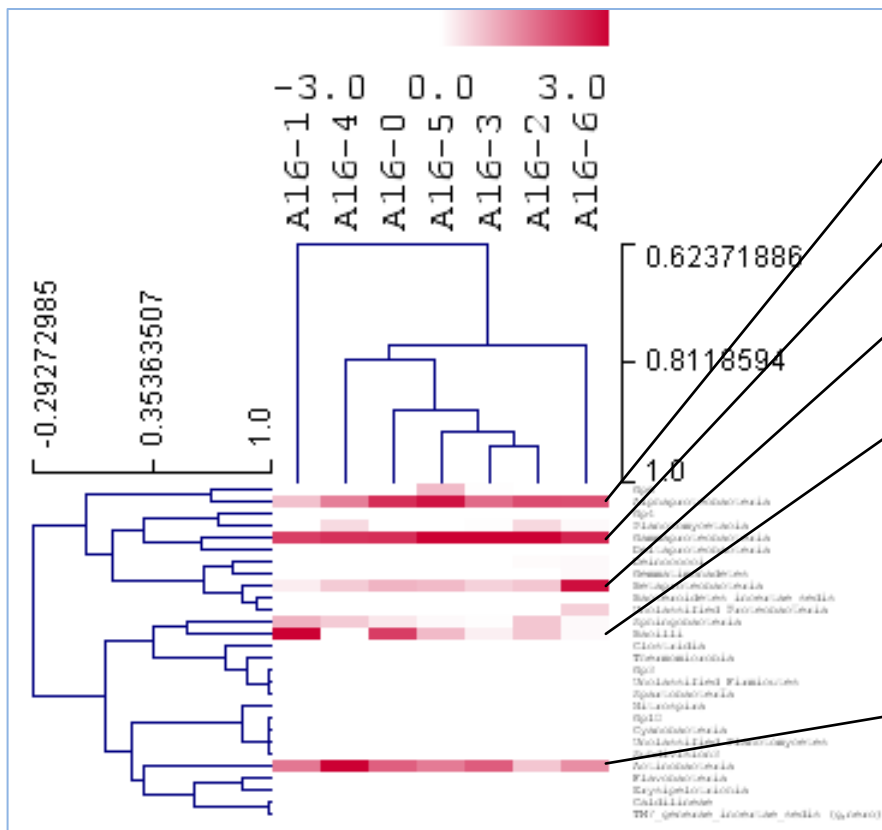
El análisis de las proporciones de las poblaciones utilizando las clases bacterianas nos permitió detectar más claramente las diferencias entre las muestras de una forma más sencilla comparada con los análisis de OTUs bacterianos (Figura 65). En el suelo control las clases bacterianas más características presentes en casi todos los muestreos son *Actinobacteria* (filo *Actinobacteria*), *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (en algunos análisis) (filo *Proteobacteria*), *Sphingobacteria* (filo *Bacteroidetes*) (mayor proporción en T2) y *Acidobacteria\_Gp6* (Gp6) (filo *Acidobacteria*) (Figura 65). En las muestras tratadas la proporción de la clase *Acidobacteria\_Gp6* (Gp6) disminuye gradualmente con el incremento de la dosis de lodo aplicada, tanto de lodo aerobio como del lodo anaerobio, siendo casi indetectable en las muestras tratadas con mayores dosis de lodos. La clase *Bacilli* (filo *Firmicutes*) aparece generalmente en los primeros muestreos en las parcelas con lodos y principalmente en aquellas con dosis intermedias, mientras que la clase *Sphingobacteria* (filo *Bacteroidetes*) aparece solo en algunos de los análisis. La clase *Gammaproteobacteria* fue la más característica de las muestras tratadas con lodos y su proporción se incrementa con el incremento de la dosis. La proporción de la clase *Actinobacteria* no es tan constante en las muestras tratadas comparadas con el suelo control, puesto que hemos observado una variación en su proporción, mientras que en el suelo control la menor proporción se detecta solamente en febrero de 2008 (T2). La proporción de la clase *Alphaproteobacteria* fue menor en AE40, AE80, AE160 y ANAE160 comparada con el suelo control (Figura 65).



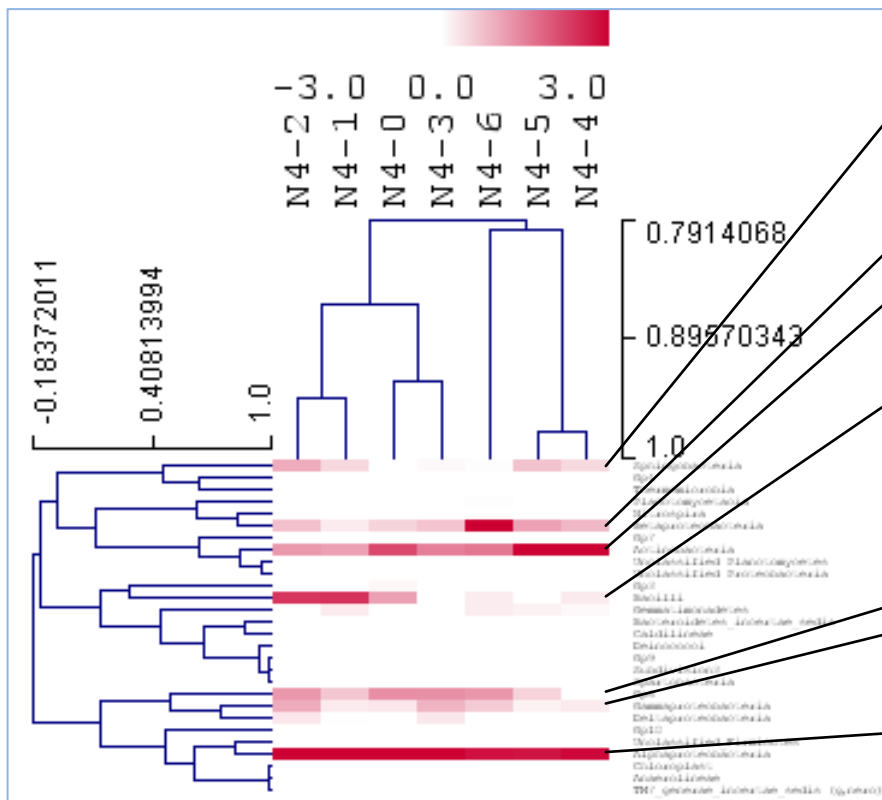
**Gp6**  
*Planctomycetacia*  
**Alphaproteobacteria**  
*Gemmatimonadetes*  
**Actinobacteria**  
*Deltaproteobacteria*  
*Bacteroidetes\_incertae\_sedis*  
*Gp3*  
*Unclassified Planctomycetes*  
*Spartobacteria*  
*Unclassified\_Firmicutes*  
**Gammaproteobacteria**  
**Betaproteobacteria**  
*Gp7*  
*Gp1*  
*Thermomicrobia*  
*Clostridia*  
*Unclassified Proteobacteria*  
*Cyanobacteria*  
*Chloroplast*  
*Caldilineae*  
*Phycisphaerae*  
*Subdivision3*  
*Opitutae*  
*Deinococci*  
**Sphingobacteria**  
**Bacilli**  
*Gp4*  
*Unclassified Verrucomicrobia*



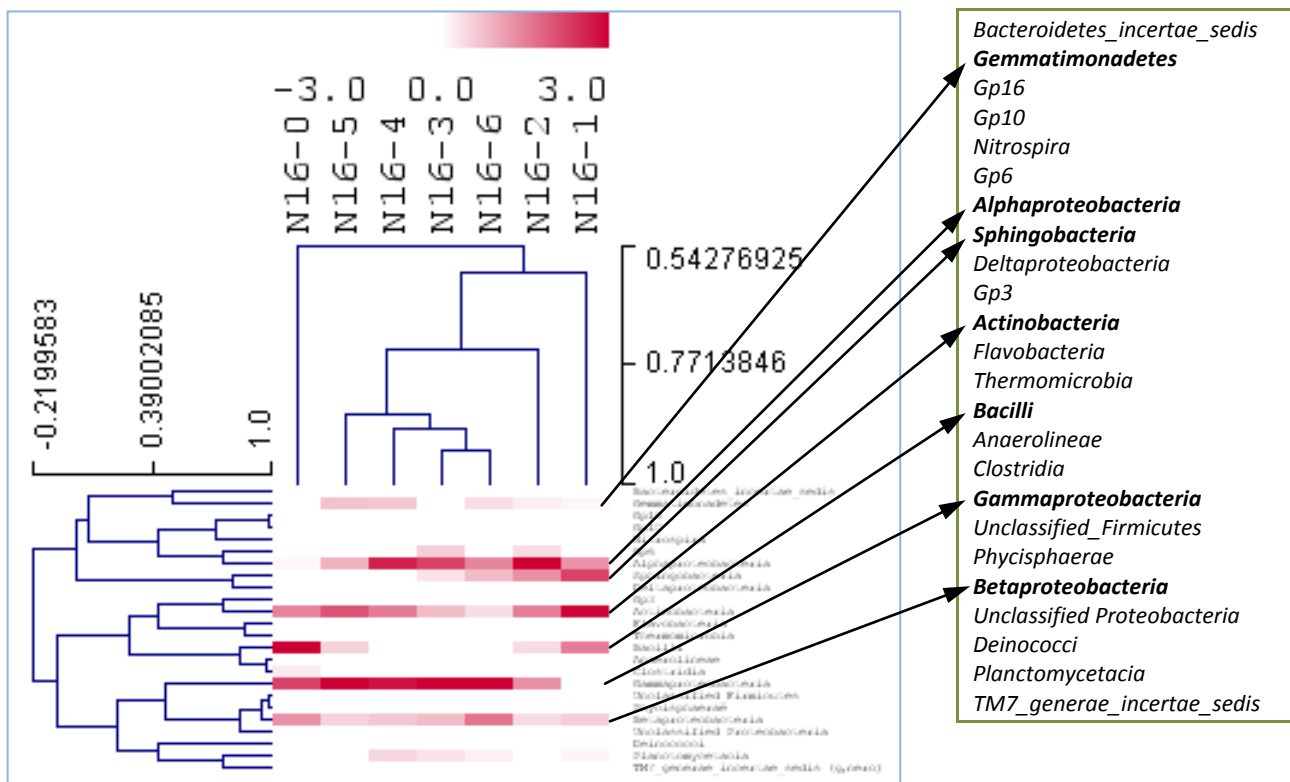
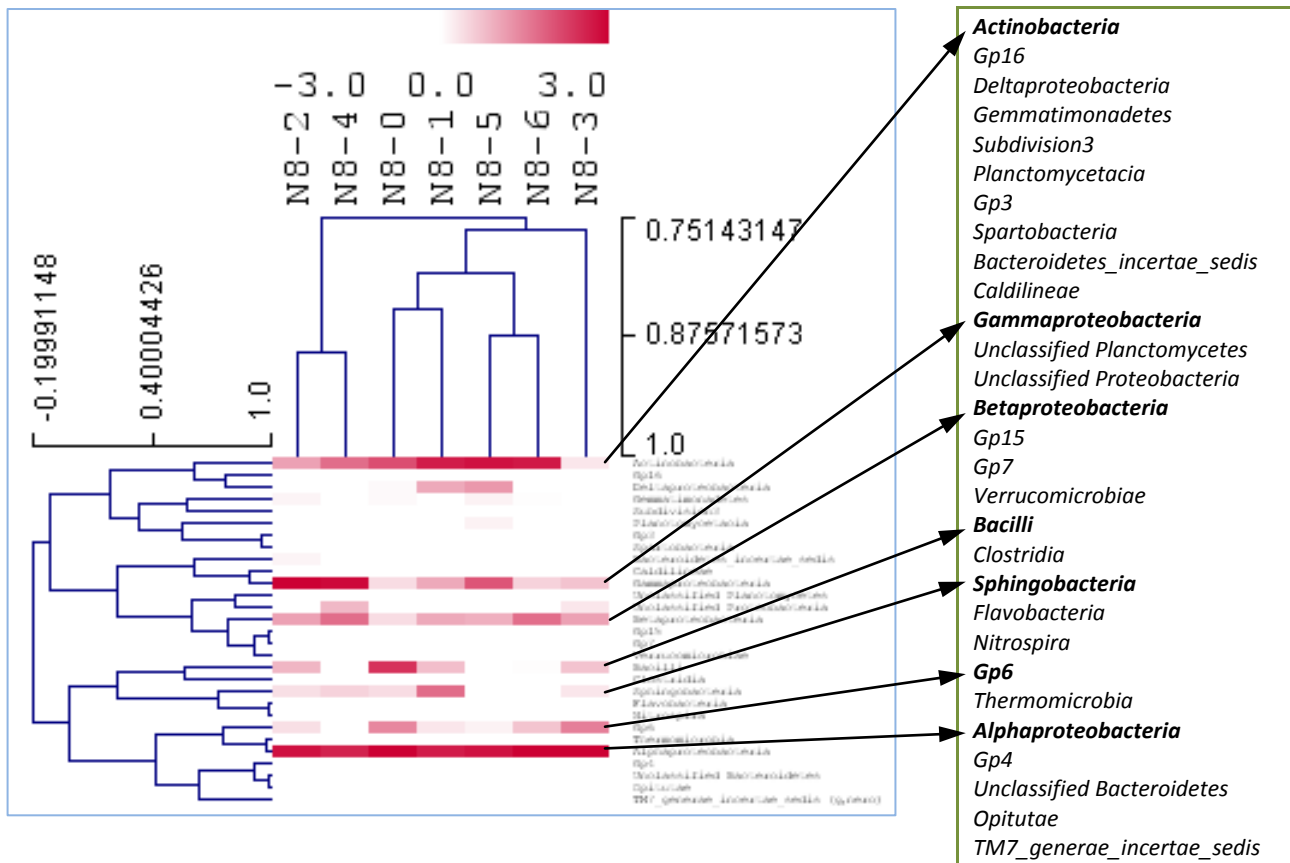
*Thermomicrobia*  
*Deinococci*  
*Caldilineae*  
*Gemmatimonadetes*  
*Cyanobacteria*  
**Bacilli**  
*Bacteroidia*  
*Clostridia*  
*Nitrospira*  
*Phycisphaerae*  
*Flavobacteria*  
*Gp16*  
*Gp7*  
*Unclassified Planctomycetes*  
*Gp4*  
*Bacteroidetes\_incertae\_sedis*  
*Gp10*  
*BRC1\_genera\_incertae\_sedis*  
*Unclassified Bacteroidetes*  
**Gammaproteobacteria**  
*Gp6*  
*Planctomycetacia*  
**Alphaproteobacteria**  
**Actinobacteria**  
*Deltaproteobacteria*  
**Sphingobacteria**  
*Gp3*  
**Betaproteobacteria**  
*Unclassified Proteobacteria*

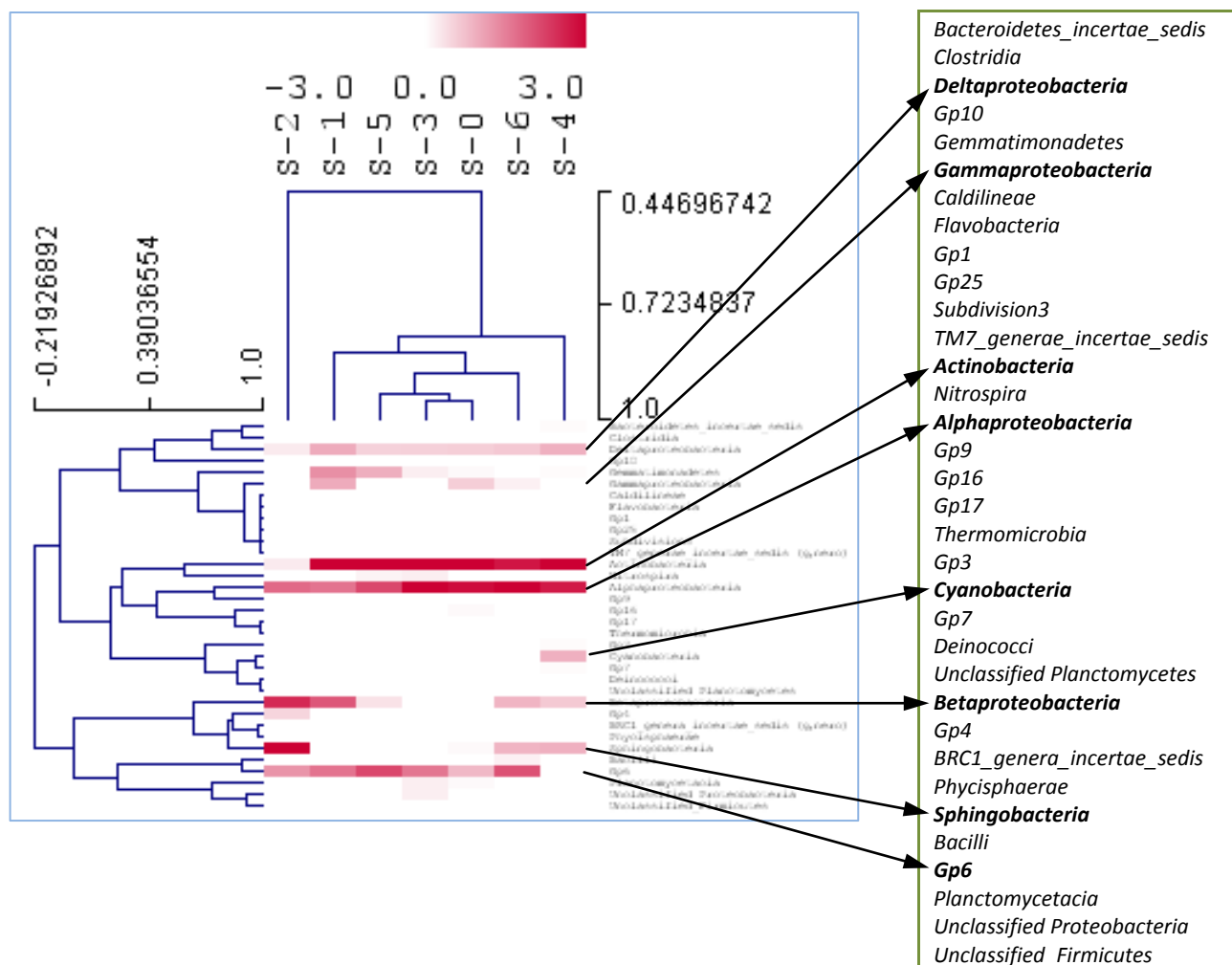


Gp6  
**Alphaproteobacteria**  
 Gp4  
 Planctomycetacia  
**Gammaproteobacteria**  
 Deltaproteobacteria  
 Deinococci  
 Gemmatimonadetes  
**Betaproteobacteria**  
 Bacteroidetes\_incertae\_sedis  
 Unclassified Proteobacteria  
 Sphingobacteria  
**Bacilli**  
 Clostridia  
 Thermomicrobia  
 Gp3  
 Unclassified\_Firmicutes  
 Spartobacteria  
 Nitrospira  
 Gp10  
 Cyanobacteria  
 Unclassified Planctomycetes  
 Subdivision3  
**Actinobacteria**  
 Flavobacteria  
 Erysipelotrichia  
 Caldilineae  
 TM7\_generae\_incertae\_sedis



**Sphingobacteria**  
 Gp4  
 Thermomicrobia  
 Planctomycetacia  
 Nitrospira  
**Betaproteobacteria**  
 Gp7  
**Actinobacteria**  
 Unclassified Planctomycetes  
 Unclassified Proteobacteria  
 Gp3  
**Bacilli**  
 Gemmatimonadetes  
 Bacteroidetes\_incertae\_sedis  
 Caldilineae  
 Deinococci  
 Gp9  
 Subdivision3  
 Spartobacteria  
 Gp6  
**Gammaproteobacteria**  
 Deltaproteobacteria  
 Gp10  
 Unclassified\_Firmicutes  
**Alphaproteobacteria**  
 Chloroplast  
 Anaerolineae  
 TM7\_generae\_incertae\_sedis



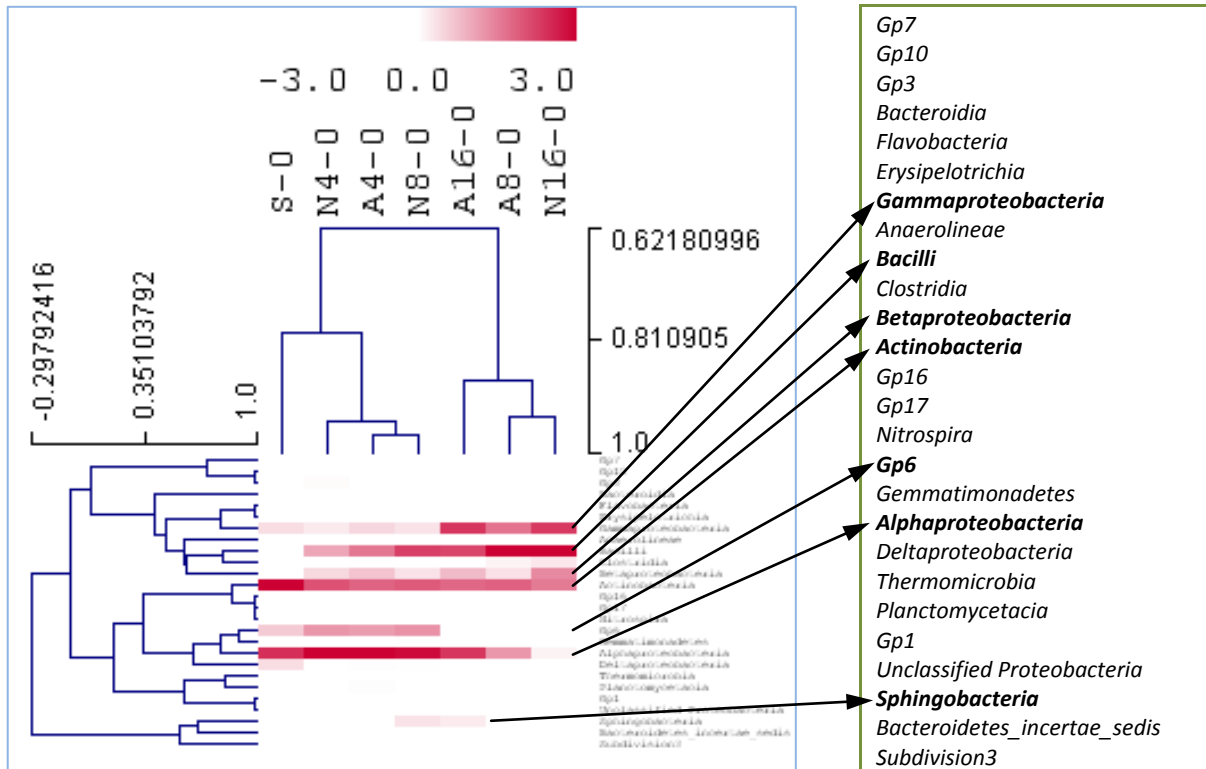


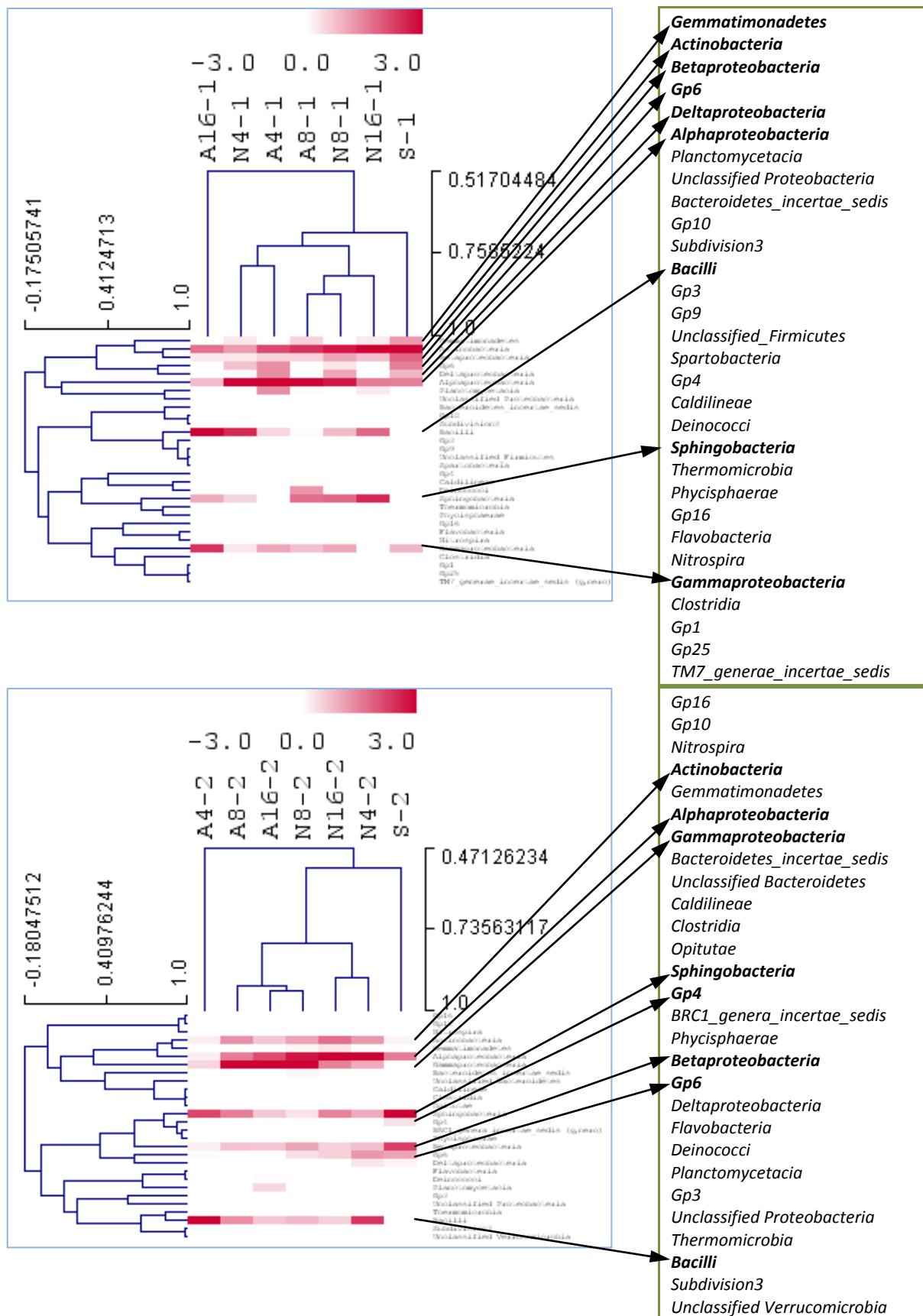
**Figura 65. Comparaciones entre las clases presentes en todos los muestreos agrupados por muestras.** Se llevó a cabo con los resultados proporcionados por el programa *Classify* de RPD10 que fueron procesados utilizando la aplicación *MeV* del conjunto de programas *TM4*. Las nomenclaturas S, A4, A8, A16, N4, N8 y N16 corresponden a las muestras de suelo control (*Soil*), AE40, AE80, AE160, ANAE40, ANAE80 y ANAE160, y los números 0 a 6 corresponden a los análisis T0 a T6. La leyenda *Gp6* corresponde a la clase *Acidobacteria\_Gp6*.

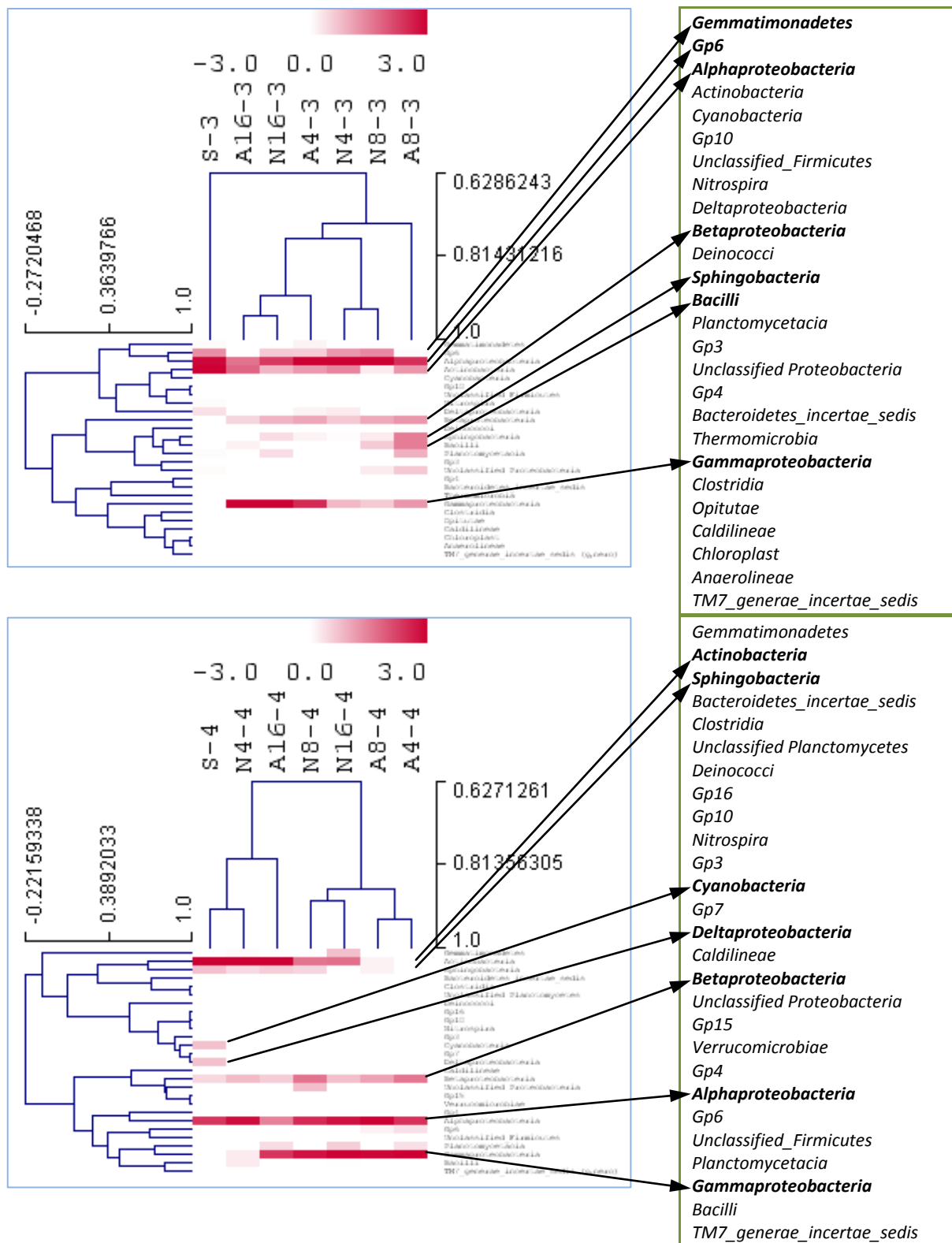
La evolución y las alteraciones en las proporciones de las clases bacterianas fueron aún más acusadas en la comparación realizada entre las parcelas tratadas con lodos y el suelo control en cada muestreo (Figura 66). Las modificaciones más significativas se manifiestan principalmente en las parcelas tratadas con las mayores dosis de lodos, persistiendo en la mayoría de los análisis incluso 2 años después de la aplicación de estos. Éstas consisten en una disminución significativa de las clases *Acidobacteria\_Gp6* (*Gp6*) (principalmente), *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria* (principalmente en el primer muestreo en ANAE160), el incremento de la clase *Gammaproteobacteria*, y una variación en la proporción de las clases *Sphingobacteria* (mayor proporción en las muestras tratadas en T0, T1 y T3, y en el suelo control en T2) y *Gemmatimonadetes* (Figura 66). En la comparación entre el suelo control y las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias de lodos hemos detectado que las principales diferencias se presentan en el incremento de la clase *Bacilli* en los primeros

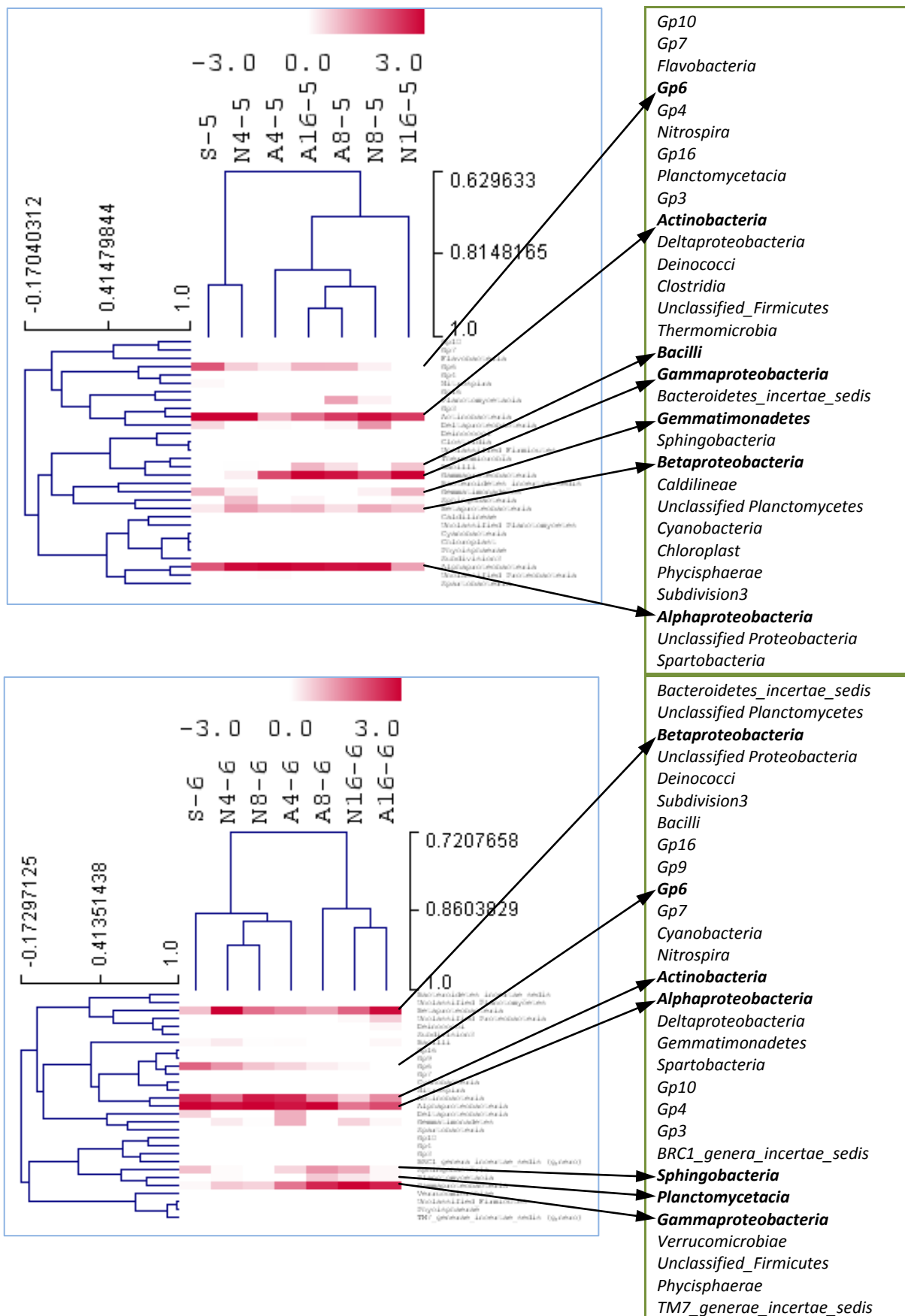


análisis y de *Gammaproteobacteria*. En octubre de 2008 (T4) hemos observado una mayor proporción de las clases *Cyanobacteria* y *Deltaproteobacteria* en el suelo control comparada con las otras parcelas, y una variación en la proporción de la clase Gemmatimonadetes en todas las muestras pareciendo existir una mayor proporción en T1 y en T3 en algunas parcelas (Figura 66). En términos generales, parece existir una cierta asociación entre una mayor proporción de las clases Gp6 (*Acidobacteria*) y *Deltaproteobacteria* con ambientes poco alterados frente a la presencia de proporciones superiores de *Beta* y *Gammaproteobacteria* en suelos muy alterados junto con *Bacilli* (*Firmicutes*) como un marcador de alteración reciente.



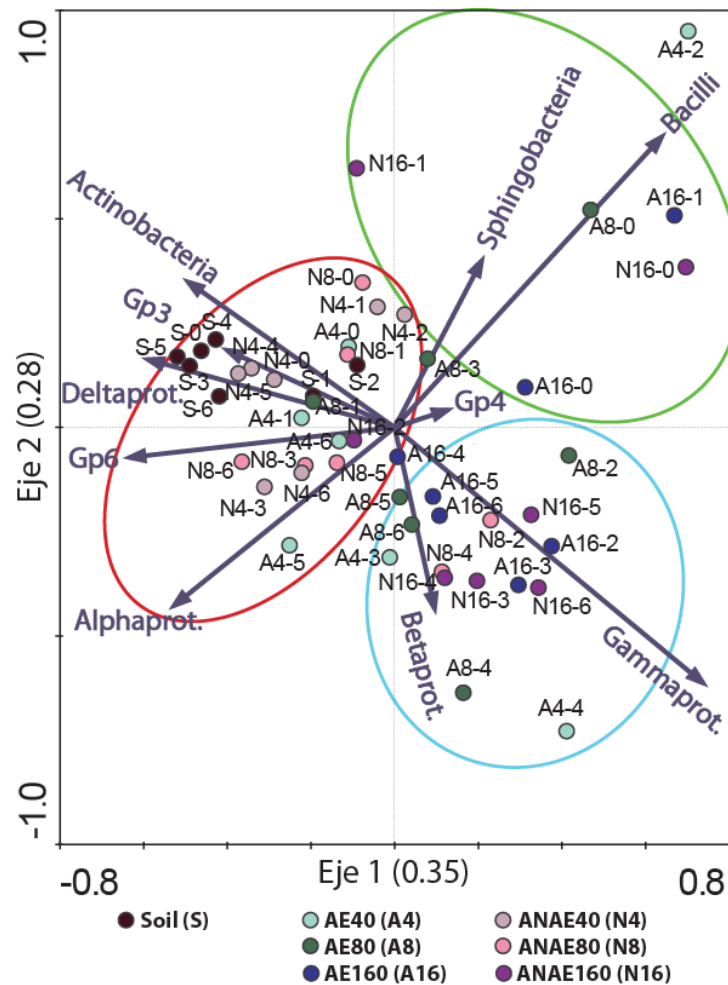






**Figura 66. Comparaciones entre las clases presentes en todas las parcelas agrupadas por muestreo. Se llevó a cabo como se describe en la Figura 65.**

Con el fin de comprobar estos datos, hemos procedido a realizar un análisis de componentes principales (PCA) que nos permite visualizar más claramente la asociación de determinadas clases con muestras específicas en función de la distribución que adoptan en el diagrama (Figura 67). En esta ordenación el eje horizontal explica un 35 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por las clases *Sphingobacteria* (filo *Bacteroidetes*), *Bacilli* (filo *Firmicutes*) y *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*) mientras que su extremo negativo se define por las clases *Actinobacteria* (filo *Actinobacteria*), *Acidobacteria\_Gp3* y *Acidobacteria\_Gp6* (filo *Acidobacteria*), *Deltaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*) (Figura 67). El eje vertical explica un 28 % de esa varianza y está definido en su extremo positivo por las clases *Sphingobacteria* y *Actinobacteria*, mientras que en su extremo negativo lo hacen las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (Figura 67). En el diagrama se pueden observar tres grupos bien diferenciados. El primero está más relacionado con una mayor proporción de las clases bacterianas *Actinobacteria* (*Actinobacteria*), *Acidobacteria\_Gp3* y *Acidobacteria\_Gp6* (*Acidobacteria*), *Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* (*Proteobacteria*) que agrupan principalmente a las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias de lodo y al suelo control (elipse roja) (Figura 67). El segundo de ellos comprende un grupo de muestras más relacionadas con las clases *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (*Proteobacteria*) y que coincide con las tratadas con mayor dosis de lodo (elipse azul) (Figura 67). La clase *Bacilli* (*Firmicutes*) define un tercer grupo de parcelas tratadas en general con las mayores dosis de lodos en los primeros muestreos (elipse verde) (Figura 67).



**Figura 67. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras del estudio respecto a las clases bacterianas más abundantes presentes en ellas.** Soil – S; AE40 – A4; AE80 – A8; AE160 – A16; ANAE40 – N4; ANAE80 – N8; ANAE160 – N16. Los valores utilizados corresponden a los muestreos del estudio (0 – T0, 1 – T1, 2 – T2, 3 – T3, 4 – T4, 5 – T5, 6 – T6). Las flechas grises indican la distribución de las clases bacterianas más abundantes en el análisis. Fue llevado a cabo con el programa *Canoco para Windows versión 4.5* utilizando un análisis de componentes principales (PCA). El primer eje explicó un 35 % de la varianza y el segundo, un 28 %. Las leyendas *Alphaprot.*, *Gammaprot.*, *Betaprot.* y *Deltaprot.* corresponden a las clases *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* pertenecientes al filo *Proteobacteria*, mientras que *Gp3*, *Gp4* y *Gp6* corresponden a las clases *Acidobacteria\_Gp3*, *Acidobacteria\_Gp4* y *Acidobacteria\_Gp6* pertenecientes al filo *Acidobacteria*.

### 3.5.3.7 OTUS CARACTERÍSTICOS DE CADA MUESTRA Y ANÁLISIS.

A partir de los datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y procesados con la aplicación *MeV* (Figura 52, Figura 54, Figura 56, Figura 58, Figura 60, Figura 62 y Figura 64), hemos comparado los OTUs exclusivos que diferencian cada una de las muestras en cada tiempo para obtener una serie de OTUs característicos de cada una de las muestras. La razón es que la población bacteriana *exclusiva* (o característica) de una parcela cuando se compara con las poblaciones de los demás tratamientos en un muestreo determinado puede ser diferente a la población de esa parcela cuando se compara con las del mismo tratamiento en otros muestreos. Así, con este análisis, pretendemos discriminar cuáles son los OTUs que son estrictamente exclusivos de cada muestra en cada tiempo (*comunes*) frente a los que aparecen influidos por las características climáticas o edafológicas de ese muestreo (*compartidos con otras muestras*) o frente a los que son exclusivos de esa parcela pero no estrictamente de ese muestreo (*compartidos con otros tiempos*).

Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
1147 <i>Alphaprot.</i>	326 <i>Actino.</i>	396 <i>Actino.</i>
660 <i>Chloroflexi</i>	1273 <i>Alphaprot.</i>	663 <i>Chloroflexi</i>
	122 <i>Acidob.</i>	1047 <i>Nitrosp.</i>
	188 <i>Actino.</i>	1057 <i>Planctom.</i>
	242 <i>Actino.</i>	1460 <i>Betaprot.</i>
	346 <i>Actino.</i>	1536 <i>Deltaprot.</i>
	353 <i>Actino.</i>	
	427 <i>Actino.</i>	
	532 <i>Bactero.</i>	
	763 <i>Firmicutes</i>	
	1151 <i>Alphaprot.</i>	
	1524 <i>Deltaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
276 <i>Actino.</i>	130 <i>Acidob.</i>	1351 <i>Betaprot.</i>
424 <i>Actino.</i>	179 <i>Actino.</i>	151 <i>Actino.</i>
659 <i>Chloroflexi</i>	560 <i>Bactero.</i>	208 <i>Actino.</i>
1123 <i>Alphaprot.</i>	789 <i>Firmicutes</i>	1122 <i>Alphaprot.</i>
1302 <i>Alphaprot.</i>	874 <i>Firmicutes</i>	1258 <i>Alphaprot.</i>
1403 <i>Betaprot.</i>	1530 <i>Deltaprot.</i>	1558 <i>Deltaprot.</i>
1923 <i>Verrucomic.</i>	2161 <i>TM7</i>	
2099 <i>Alphaprot.</i>		
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
483 <i>Bactero.</i>	507 <i>Bactero.</i>	663 <i>Chloroflexi</i>
1317 <i>Betaprot.</i>	1361 <i>Betaprot.</i>	1286 <i>Alphaprot.</i>
1387 <i>Betaprot.</i>	1397 <i>Betaprot.</i>	
1066 <i>Alphaprot.</i>	1346 <i>Betaprot.</i>	
	1532 <i>Deltaprot.</i>	
	1543 <i>Deltaprot.</i>	
	1990 <i>BRC1</i>	

Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
1157 <i>Alphaprot.</i>	191 <i>Actino.</i>	421 <i>Actino.</i>
1196 <i>Alphaprot.</i>	257 <i>Actino.</i>	2017 <i>Cyanobac.</i>
1393 <i>Betaprot.</i>	1169 <i>Alphaprot.</i>	1287 <i>Alphaprot.</i>
	1144 <i>Alphaprot.</i>	
	1538 <i>Deltaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
235 <i>Actino.</i>	148 <i>Actino.</i>	118 <i>Acidob.</i>
675 <i>Deinoc-Therm.</i>	183 <i>Actino.</i>	208 <i>Actino.</i>
1324 <i>Betaprot.</i>	245 <i>Actino.</i>	482 <i>Bactero.</i>
1364 <i>Betaprot.</i>	335 <i>Actino.</i>	1047 <i>Nitrosp.</i>
	472 <i>Bactero.</i>	1145 <i>Alphaprot.</i>
	528 <i>Bactero.</i>	1522 <i>Deltaprot.</i>
	529 <i>Bactero.</i>	1531 <i>Deltaprot.</i>
	948 <i>Firmicutes</i>	1542 <i>Deltaprot.</i>
	1357 <i>Betaprot.</i>	
	1509 <i>Deltaprot.</i>	
	2017 <i>Cyanobac.</i>	
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
1051 <i>Planctom.</i>	230 <i>Actino.</i>	1047 <i>Nitrosp.</i>
1526 <i>Deltaprot.</i>	289 <i>Actino.</i>	1122 <i>Alphaprot.</i>
1527 <i>Deltaprot.</i>	299 <i>Actino.</i>	1520 <i>Deltaprot.</i>
1541 <i>Deltaprot.</i>	300 <i>Actino.</i>	
1851 <i>Gammaprot</i>	735 <i>Firmicutes</i>	
	969 <i>Firmicutes</i>	
	1298 <i>Alphaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
518 <i>Bactero.</i>	499 <i>Bactero.</i>	182 <i>Actino.</i>
803 <i>Firmicutes</i>	138 <i>Acidob.</i>	1258 <i>Alphaprot.</i>
1100 <i>Alphaprot.</i>	354 <i>Actino.</i>	1520 <i>Deltaprot.</i>
1347 <i>Betaprot.</i>	768 <i>Firmicutes</i>	
1529 <i>Deltaprot.</i>	1458 <i>Betaprot.</i>	
	1846 <i>Gammaprot.</i>	
	2001 <i>Cyanobac.</i>	

**Tabla 39. OTUs característicos del suelo control (*Soil*) en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa *TM4*. *Comp.* significa compartidos.

En estos análisis, existen diferencias considerables entre la composición bacteriana en OTUs del suelo control y las muestras tratadas con lodos aunque la categorización en grupos bacterianos no es clara. En el suelo control, los OTUs más característicos fueron principalmente los que correspondieron a las clases *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta* y *Delta*) (Tabla 39). Las

muestras tratadas con las menores dosis de lodo aerobio y anaerobio (AE40 y ANAE40) fueron similares al suelo control, a excepción de la presencia de una mayor proporción de OTUs del filo *Firmicutes* (sobre todo de la clase *Bacilli*) y de la clase *Alphaproteobacteria*, y una menor proporción de los filos *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (Tabla 40 y Tabla 43). En las muestras tratadas con dosis intermedias de lodos (AE80 y ANAE80), hemos observado una proporción aún mayor de OTUs de los filos *Firmicutes* (principalmente en los primeros análisis), y de las clases *Alpha*, *Gamma* y *Deltaproteobacteria* (Tabla 41 y Tabla 44). En AE160 los OTUs más característicos corresponden al filo *Bacteroidetes* y a la clase *Gammaproteobacteria* (Tabla 42). Los OTUs característicos de los muestreos de ANAE160 pertenecen a los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (en los primeros muestreos), y principalmente a la clase *Gammaproteobacteria* (Tabla 45).

Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
660 <i>Chloroflexi</i>	239 <i>Actino.</i>	1115 <i>Alphaprot.</i>
125 <i>Acidob.</i>	735 <i>Firmicutes</i>	1145 <i>Alphaprot.</i>
137 <i>Acidob.</i>	1094 <i>Alphaprot.</i>	125 <i>Acidob.</i>
248 <i>Actino.</i>	1126 <i>Alphaprot.</i>	134 <i>Acidob.</i>
969 <i>Firmicutes</i>	1279 <i>Alphaprot.</i>	484 <i>Bactero.</i>
1051 <i>Planctom.</i>		675 <i>Deinoc-Therm.</i>
1169 <i>Alphaprot.</i>		1308 <i>Alphaprot.</i>
1308 <i>Alphaprot.</i>		1359 <i>Betaprot.</i>
		1382 <i>Betaprot.</i>
		1388 <i>Betaprot.</i>
		1456 <i>Betaprot.</i>
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
1520 <i>Deltaprot.</i>	182 <i>Actino.</i>	1145 <i>Alphaprot.</i>
327 <i>Actino.</i>	1207 <i>Alphaprot.</i>	
1216 <i>Alphaprot.</i>	1319 <i>Betaprot.</i>	
1274 <i>Alphaprot.</i>	1591 <i>Gammaprot.</i>	
1286 <i>Alphaprot.</i>	1844 <i>Gammaprot.</i>	
1312 <i>Alphaprot.</i>		
1441 <i>Betaprot.</i>		
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
483 <i>Bactero.</i>	275 <i>Actino.</i>	513 <i>Bactero.</i>
510 <i>Bactero.</i>	421 <i>Actino.</i>	1846 <i>Gammaprot.</i>
482 <i>Bactero.</i>	478 <i>Bactero.</i>	1053 <i>Planctom.</i>
802 <i>Firmicutes</i>		1097 <i>Alphaprot.</i>
534 <i>Bactero.</i>		1136 <i>Alphaprot.</i>
		1382 <i>Betaprot.</i>
		1388 <i>Betaprot.</i>
		1456 <i>Betaprot.</i>
		1923 <i>Verrucomic.</i>
		1925 <i>Verrucomic.</i>

Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
1387 <i>Betaprot.</i>	1317 <i>Betaprot.</i>	275 <i>Actino.</i>
1140 <i>Alphaprot.</i>	1528 <i>Deltaprot.</i>	1053 <i>Planctom.</i>
1912 <i>Verrucomic.</i>	898 <i>Firmicutes</i>	424 <i>Actino.</i>
144 <i>Acidob.</i>	1143 <i>Alphaprot.</i>	1527 <i>Deltaprot.</i>
148 <i>Actino.</i>		1912 <i>Verrucomic.</i>
1062 <i>Alphaprot.</i>		
1117 <i>Alphaprot.</i>		
1205 <i>Alphaprot.</i>		
1536 <i>Deltaprot.</i>		
2099 <i>Alphaprot.</i>		
Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
474 <i>Bactero.</i>	1403 <i>Betaprot.</i>	1393 <i>Betaprot.</i>
	805 <i>Firmicutes</i>	1108 <i>Alphaprot.</i>
	1359 <i>Betaprot.</i>	1303 <i>Alphaprot.</i>
	1269 <i>Alphaprot.</i>	1147 <i>Alphaprot.</i>
	1017 <i>Firmicutes</i>	
	1543 <i>Deltaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
1839 <i>Gammaprot.</i>	1120 <i>Alphaprot.</i>	1108 <i>Alphaprot.</i>
257 <i>Actino.</i>	1132 <i>Alphaprot.</i>	1396 <i>Betaprot.</i>
528 <i>Bactero.</i>	1164 <i>Alphaprot.</i>	1136 <i>Alphaprot.</i>
659 <i>Chloroflexi</i>	1304 <i>Alphaprot.</i>	1196 <i>Alphaprot.</i>
1068 <i>Alphaprot.</i>	1346 <i>Betaprot.</i>	
1161 <i>Alphaprot.</i>	1378 <i>Betaprot.</i>	
1920 <i>Verrucomic.</i>	1384 <i>Betaprot.</i>	
	1534 <i>Deltaprot.</i>	
	1842 <i>Gammaprot.</i>	
	1993 <i>Cyanobac.</i>	
	2017 <i>Cyanobac.</i>	
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
133 <i>Acidob.</i>	191 <i>Actino.</i>	1522 <i>Deltaprot.</i>
276 <i>Actino.</i>	663 <i>Chloroflexi</i>	270 <i>Actino.</i>
391 <i>Actino.</i>	1273 <i>Alphaprot.</i>	513 <i>Bactero.</i>
471 <i>Bactero.</i>	1523 <i>Deltaprot.</i>	
529 <i>Bactero.</i>	1533 <i>Deltaprot.</i>	
1305 <i>Alphaprot.</i>	1925 <i>Verrucomic.</i>	
1813 <i>Gammaprot.</i>		
246 <i>Actino.</i>		

**Tabla 40. OTUs característicos de AE40 en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa *TM4*.



Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
1108 <i>Alphaprot.</i>	154 <i>Actino.</i>	391 <i>Actino.</i>
1319 <i>Betaprot.</i>	205 <i>Actino.</i>	483 <i>Bactero.</i>
246 <i>Actino.</i>	329 <i>Actino.</i>	
275 <i>Actino.</i>	334 <i>Actino.</i>	
804 <i>Firmicutes</i>	360 <i>Actino.</i>	
902 <i>Firmicutes</i>	454 <i>Bactero.</i>	
969 <i>Firmicutes</i>	792 <i>Firmicutes</i>	
1387 <i>Betaprot.</i>	796 <i>Firmicutes</i>	
	801 <i>Firmicutes</i>	
	815 <i>Firmicutes</i>	
	877 <i>Firmicutes</i>	
	1136 <i>Alphaprot.</i>	
	1139 <i>Alphaprot.</i>	
	1807 <i>Gammaprot.</i>	
	1879 <i>Synergist.</i>	
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
659 <i>Chloroflexi</i>	1533 <i>Deltaprot.</i>	1858 <i>Gammaprot.</i>
1315 <i>Alphaprot.</i>	335 <i>Actino.</i>	
148 <i>Actino.</i>	478 <i>Bactero.</i>	
276 <i>Actino.</i>	531 <i>Bactero.</i>	
327 <i>Actino.</i>	1138 <i>Alphaprot.</i>	
1047 <i>Nitrosp.</i>	1254 <i>Alphaprot.</i>	
1123 <i>Alphaprot.</i>		
1329 <i>Betaprot.</i>		
1526 <i>Deltaprot.</i>		
1833 <i>Gammaprot.</i>		
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
1813 <i>Gammaprot.</i>	245 <i>Actino.</i>	738 <i>Firmicutes</i>
235 <i>Actino.</i>	489 <i>Bactero.</i>	150 <i>Actino.</i>
1323 <i>Betaprot.</i>	532 <i>Bactero.</i>	1403 <i>Betaprot.</i>
1460 <i>Betaprot.</i>	699 <i>Firmicutes</i>	
1558 <i>Deltaprot.</i>	700 <i>Firmicutes</i>	
1710 <i>Gammaprot.</i>	1130 <i>Alphaprot.</i>	
1854 <i>Gammaprot.</i>	1359 <i>Betaprot.</i>	
	1385 <i>Betaprot.</i>	
	1814 <i>Gammaprot.</i>	
	1861 <i>Gammaprot.</i>	

Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
1393 <i>Betaprot.</i>	270 <i>Actino.</i>	134 <i>Acidob.</i>
286 <i>Actino.</i>	484 <i>Bactero.</i>	770 <i>Firmicutes</i>
1305 <i>Alphaprot.</i>	737 <i>Firmicutes</i>	1145 <i>Alphaprot.</i>
1330 <i>Betaprot.</i>	786 <i>Firmicutes</i>	
	1104 <i>Alphaprot.</i>	
	1149 <i>Alphaprot.</i>	
	1159 <i>Alphaprot.</i>	
	1207 <i>Alphaprot.</i>	
	1311 <i>Alphaprot.</i>	
	1413 <i>Betaprot.</i>	
	1535 <i>Deltaprot.</i>	
	2001 <i>Cyanobac.</i>	
Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
1454 <i>Betaprot.</i>	1067 <i>Alphaprot.</i>	1216 <i>Alphaprot.</i>
1853 <i>Gammaprot.</i>	1143 <i>Alphaprot.</i>	1324 <i>Betaprot.</i>
2099 <i>Alphaprot.</i>	1276 <i>Alphaprot.</i>	1334 <i>Betaprot.</i>
		1401 <i>Betaprot.</i>
		134 <i>Acidob.</i>
		1279 <i>Alphaprot.</i>
		1351 <i>Betaprot.</i>
		1858 <i>Gammaprot.</i>
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
137 <i>Acidob.</i>	663 <i>Chloroflexi</i>	118 <i>Acidob.</i>
257 <i>Actino.</i>	1236 <i>Alphaprot.</i>	250 <i>Actino.</i>
332 <i>Actino.</i>		510 <i>Bactero.</i>
371 <i>Actino.</i>		1536 <i>Deltaprot.</i>
1258 <i>Alphaprot.</i>		
1303 <i>Alphaprot.</i>		
1541 <i>Deltaprot.</i>		
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
171 <i>Actino.</i>	207 <i>Actino.</i>	1859 <i>Gammaprot.</i>
396 <i>Actino.</i>	183 <i>Actino.</i>	421 <i>Actino.</i>
427 <i>Actino.</i>	472 <i>Bactero.</i>	1051 <i>Planctom.</i>
474 <i>Bactero.</i>	534 <i>Bactero.</i>	1279 <i>Alphaprot.</i>
1059 <i>Planctom.</i>	1095 <i>Alphaprot.</i>	1287 <i>Alphaprot.</i>
1281 <i>Alphaprot.</i>	1527 <i>Deltaprot.</i>	1312 <i>Alphaprot.</i>
	1542 <i>Deltaprot.</i>	
	1990 <i>BRC1</i>	

**Tabla 41. OTUs característicos de AE80 en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa TM4.

**Tabla 42. OTUs característicos de AE160 en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa TM4.

Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
1097 <i>Alphaprot.</i>	208 <i>Actino.</i>	276 <i>Actino.</i>
1319 <i>Betaprot.</i>	342 <i>Actino.</i>	383 <i>Actino.</i>
182 <i>Actino.</i>	560 <i>Bactero.</i>	428 <i>Actino.</i>
804 <i>Firmicutes</i>	1022 <i>Firmicutes</i>	761 <i>Firmicutes</i>
	1122 <i>Alphaprot.</i>	1321 <i>Betaprot.</i>
	1366 <i>Betaprot.</i>	1802 <i>Gammaprot.</i>
	1401 <i>Betaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
246 <i>Actino.</i>	815 <i>Firmicutes</i>	1802 <i>Gammaprot.</i>
286 <i>Actino.</i>	205 <i>Actino.</i>	770 <i>Firmicutes</i>
	472 <i>Bactero.</i>	1853 <i>Gammaprot.</i>
	489 <i>Bactero.</i>	
	533 <i>Bactero.</i>	
	898 <i>Firmicutes</i>	
	1330 <i>Betaprot.</i>	
	1614 <i>Gammaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
484 <i>Bactero.</i>	488 <i>Bactero.</i>	675 <i>Deinoc-Therm.</i>
1351 <i>Betaprot.</i>	261 <i>Actino.</i>	167 <i>Actino.</i>
1591 <i>Gammaprot.</i>	486 <i>Bactero.</i>	1055 <i>Planctom.</i>
1710 <i>Gammaprot.</i>	573 <i>Bactero.</i>	1273 <i>Alphaprot.</i>
	1050 <i>Planctom.</i>	1520 <i>Deltaprot.</i>
	1108 <i>Alphaprot.</i>	
	1329 <i>Betaprot.</i>	
	1523 <i>Deltaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
425 <i>Actino.</i>	534 <i>Bactero.</i>	171 <i>Actino.</i>
	168 <i>Actino.</i>	235 <i>Actino.</i>
	282 <i>Actino.</i>	383 <i>Actino.</i>
	659 <i>Chloroflexi</i>	805 <i>Firmicutes</i>
	1121 <i>Alphaprot.</i>	1055 <i>Planctom.</i>
	1261 <i>Alphaprot.</i>	1520 <i>Deltaprot.</i>

Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
151 <i>Actino.</i>	1144 <i>Alphaprot.</i>	133 <i>Acidob.</i>
275 <i>Actino.</i>	245 <i>Actino.</i>	1062 <i>Alphaprot.</i>
335 <i>Actino.</i>	1090 <i>Alphaprot.</i>	118 <i>Acidob.</i>
1585 <i>Gammaprot.</i>	1310 <i>Alphaprot.</i>	1127 <i>Alphaprot.</i>
	1853 <i>Gammaprot.</i>	335 <i>Actino.</i>
		1157 <i>Alphaprot.</i>
		1520 <i>Deltaprot.</i>
		1526 <i>Deltaprot.</i>
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
675 <i>Deinoc-Therm.</i>	138 <i>Acidob.</i>	510 <i>Bactero.</i>
486 <i>Bactero.</i>	528 <i>Bactero.</i>	1147 <i>Alphaprot.</i>
539 <i>Bactero.</i>	766 <i>Firmicutes</i>	1287 <i>Alphaprot.</i>
805 <i>Firmicutes</i>	768 <i>Firmicutes</i>	
1123 <i>Alphaprot.</i>	1017 <i>Firmicutes</i>	
1923 <i>Verrucomi.</i>	1069 <i>Alphaprot.</i>	
	1130 <i>Alphaprot.</i>	
	1151 <i>Alphaprot.</i>	
	1925 <i>Verrucomi.</i>	
	658 <i>Chloroflexi</i>	
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
1066 <i>Alphaprot.</i>	472 <i>Bactero.</i>	424 <i>Actino.</i>
1531 <i>Deltaprot.</i>	660 <i>Chloroflexi</i>	1117 <i>Alphaprot.</i>
1858 <i>Gammaprot.</i>	1274 <i>Alphaprot.</i>	1216 <i>Alphaprot.</i>
	1311 <i>Alphaprot.</i>	1536 <i>Deltaprot.</i>
	1524 <i>Deltaprot.</i>	

Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
257 <i>Actino.</i>	209 <i>Actino.</i>	1169 <i>Alphaprot.</i>
1302 <i>Betaprot.</i>	289 <i>Actino.</i>	1196 <i>Alphaprot.</i>
	332 <i>Actino.</i>	1055 <i>Planctom.</i>
	514 <i>Bactero.</i>	327 <i>Actino.</i>
	532 <i>Bactero.</i>	428 <i>Actino.</i>
	535 <i>Bactero.</i>	802 <i>Firmicutes</i>
	1138 <i>Alphaprot.</i>	1062 <i>Alphaprot.</i>
	1447 <i>Betaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
660 <i>Chloroflexi</i>	482 <i>Bactero.</i>	1169 <i>Alphaprot.</i>
133 <i>Acidob.</i>	499 <i>Bactero.</i>	1844 <i>Gammaprot.</i>
632 <i>Bactero.</i>	539 <i>Bactero.</i>	
1053 <i>Planctom.</i>	773 <i>Firmicutes</i>	
1067 <i>Alphaprot.</i>	927 <i>Firmicutes</i>	
1145 <i>Alphaprot.</i>	1017 <i>Firmicutes</i>	
1258 <i>Alphaprot.</i>	1470 <i>Deltaprot.</i>	
1287 <i>Alphaprot.</i>	1533 <i>Deltaprot.</i>	
1381 <i>Betaprot.</i>	1856 <i>Gammaprot.</i>	
1443 <i>Betaprot.</i>	2099 <i>Alphaprot.</i>	
1920 <i>Verrucomi.</i>		
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
1396 <i>Betaprot.</i>	510 <i>Bactero.</i>	675 <i>Deinoc-Therm.</i>
118 <i>Acidob.</i>	528 <i>Bactero.</i>	761 <i>Firmicutes</i>
422 <i>Actino.</i>	1132 <i>Alphaprot.</i>	770 <i>Firmicutes</i>
1059 <i>Planctom.</i>	1146 <i>Alphaprot.</i>	1317 <i>Betaprot.</i>
1305 <i>Alphaprot.</i>	1274 <i>Alphaprot.</i>	1844 <i>Gammaprot.</i>
1558 <i>Deltaprot.</i>	1310 <i>Alphaprot.</i>	
1843 <i>Gammaprot.</i>	1361 <i>Betaprot.</i>	
	1612 <i>Gammaprot.</i>	
	1678 <i>Gammaprot.</i>	
	1923 <i>Verrucomi.</i>	
	2005 <i>Cyanobac.</i>	

Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
1196 <i>Alphaprot.</i>	205 <i>Actino.</i>	151 <i>Actino.</i>
1051 <i>Planctom.</i>	170 <i>Actino.</i>	658 <i>Chloroflexi</i>
1522 <i>Deltaprot.</i>	208 <i>Actino.</i>	1388 <i>Betaprot.</i>
2161 <i>TM7</i>	505 <i>Bactero.</i>	1396 <i>Betaprot.</i>
	969 <i>Firmicutes</i>	1454 <i>Betaprot.</i>
	1099 <i>Alphaprot.</i>	1458 <i>Betaprot.</i>
	1512 <i>Deltaprot.</i>	1526 <i>Deltaprot.</i>
	1542 <i>Deltaprot.</i>	
	1999 <i>Cyanobac.</i>	
Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
632 <i>Bactero.</i>	1397 <i>Betaprot.</i>	1526 <i>Deltaprot.</i>
	207 <i>Actino.</i>	427 <i>Actino.</i>
	478 <i>Bactero.</i>	1053 <i>Planctom.</i>
	1854 <i>Gammaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
1145 <i>Alphaprot.</i>	535 <i>Bactero.</i>	396 <i>Actino.</i>
1317 <i>Betaprot.</i>	326 <i>Actino.</i>	171 <i>Actino.</i>
1558 <i>Deltaprot.</i>	338 <i>Actino.</i>	286 <i>Actino.</i>
1857 <i>Gammaprot.</i>	383 <i>Actino.</i>	534 <i>Bactero.</i>
1401 <i>Betaprot.</i>	529 <i>Bactero.</i>	1393 <i>Betaprot.</i>
	537 <i>Bactero.</i>	1441 <i>Betaprot.</i>
	1113 <i>Alphaprot.</i>	1458 <i>Betaprot.</i>
	1143 <i>Alphaprot.</i>	
	1464 <i>Deltaprot.</i>	
	1543 <i>Deltaprot.</i>	
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
1351 <i>Betaprot.</i>	256 <i>Actino.</i>	802 <i>Firmicutes</i>
391 <i>Actino.</i>	786 <i>Firmicutes</i>	250 <i>Actino.</i>
1047 <i>Nitrosp.</i>	1079 <i>Alphaprot.</i>	428 <i>Actino.</i>
1100 <i>Alphaprot.</i>	1108 <i>Alphaprot.</i>	1381 <i>Betaprot.</i>
1334 <i>Betaprot.</i>	1413 <i>Betaprot.</i>	
1347 <i>Betaprot.</i>	1448 <i>Betaprot.</i>	
1541 <i>Deltaprot.</i>	1539 <i>Deltaprot.</i>	

**Tabla 43. OTUs característicos de ANAE40 en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa *TM4*.

Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
770 Firmicutes	1146 Alphaprot.	474 Bactero.
	1265 Alphaprot.	738 Firmicutes
	1287 Alphaprot.	1317 Betaprot.
		179 Actino.
		513 Bactero.
		632 Bactero.
		1130 Alphaprot.
		1161 Alphaprot.
		1441 Betaprot.
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
286 Actino.	326 Actino.	0
573 Bactero.	1205 Alphaprot.	421 Actino.
1047 Nitrosp.	1464 Deltaprot.	877 Firmicutes
270 Actino.	1527 Deltaprot.	1140 Alphaprot.
427 Actino.	1589 Gammaprot.	1334 Betaprot.
486 Bactero.		1541 Deltaprot.
529 Bactero.		
805 Firmicutes		
1057 Planctom.		
1329 Betaprot.		
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
539 Bactero.	1591 Gammaprot.	151 Actino.
1312 Alphaprot.	1059 Planctom.	391 Actino.
327 Actino.	1258 Alphaprot.	425 Actino.
802 Firmicutes	1912 Verrucomi.	659 Chloroflexi
1321 Betaprot.		877 Firmicutes
134 Acidob.		1853 Gammaprot.
Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
144 Acidob.	241 Actino.	648 Chloroflexi
660 Chloroflexi	1050 Planctom.	1054 Planctom.
1330 Betaprot.	1100 Alphaprot.	1067 Alphaprot.
1351 Betaprot.	1298 Alphaprot.	1286 Alphaprot.
1833 Gammaprot.	2070 OP10	

Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
137 Acidob.	125 Acidob.	1387 Betaprot.
167 Actino.	1367 Betaprot.	648 Chloroflexi
663 Chloroflexi	1530 Deltaprot.	877 Firmicutes
1364 Betaprot.	1935 Verrucomi.	969 Firmicutes
1403 Betaprot.		1144 Alphaprot.
		1161 Alphaprot.
		1369 Betaprot.
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
133 Acidob.	329 Actino.	276 Actino.
246 Actino.	650 Chloroflexi	424 Actino.
332 Actino.	948 Firmicutes	1305 Alphaprot.
1053 Planctom.	1274 Alphaprot.	1369 Betaprot.
1302 Alphaprot.	1361 Betaprot.	1387 Betaprot.
1401 Betaprot.	1461 Deltaprot.	
1542 Deltaprot.	1525 Deltaprot.	
1920 Verrucomi.		
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
259 Actino.	1127 Alphaprot.	148 Actino.
235 Actino.	287 Actino.	179 Actino.
1388 Betaprot.	347 Actino.	738 Firmicutes
1843 Gammaprot.	1169 Alphaprot.	1055 Planctom.
2161 TM7	1304 Alphaprot.	1130 Alphaprot.
	1333 Betaprot.	1144 Alphaprot.
	1930 Verrucomi.	1323 Betaprot.
		1324 Betaprot.

**Tabla 44. OTUs característicos de ANAE80 en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa TM4.

Comp. con otras muestras (T0)	Común	Comp. con otros tiempos
902 Firmicutes	510 Bactero.	1196 Alphaprot.
1366 Betaprot.	837 Firmicutes	1396 Betaprot.
1319 Betaprot.	874 Firmicutes	
1585 Gammaprot.	898 Firmicutes	
	903 Firmicutes	
	1137 Alphaprot.	
	658 Chloroflexi	
Comp. con otras muestras (T1)	Común	Comp. con otros tiempos
134 Acidob.	487 Bactero.	474 Bactero.
246 Actino.	250 Actino.	137 Acidob.
270 Actino.	332 Actino.	499 Bactero.
1333 Betaprot.	736 Firmicutes	534 Bactero.
1522 Deltaprot.	1108 Alphaprot.	1333 Betaprot.
396 Actino.		
Comp. con otras muestras (T2)	Común	Comp. con otros tiempos
118 Acidob.	229 Actino.	137 Acidob.
1854 Gammaprot.	1138 Alphaprot.	1047 Nitrosp.
1312 Alphaprot.	1369 Betaprot.	528 Bactero.
	1540 Deltaprot.	1305 Alphaprot.
Comp. con otras muestras (T3)	Común	Comp. con otros tiempos
148 Actino.	663 Chloroflexi	137 Acidob.
1097 Alphaprot.	956 Firmicutes	1839 Gammaprot.
1205 Alphaprot.	1243 Alphaprot.	499 Bactero.
425 Actino.	1321 Betaprot.	1274 Alphaprot.
1859 Gammaprot.	1464 Deltaprot.	
	1844 Gammaprot.	

Comp. con otras muestras (T4)	Común	Comp. con otros tiempos
1286 Alphaprot.	276 Actino.	1813 Gammaprot.
529 Bactero.	282 Actino.	151 Actino.
1216 Alphaprot.	804 Firmicutes	487 Bactero.
257 Actino.	1258 Alphaprot.	1323 Betaprot.
1287 Alphaprot.	1329 Betaprot.	2161 TM7
1305 Alphaprot.	674 Deinoc-Therm.	
Comp. con otras muestras (T5)	Común	Comp. con otros tiempos
573 Bactero.	248 Actino.	483 Bactero.
738 Firmicutes	560 Bactero.	518 Bactero.
1053 Plactom.	751 Firmicutes	803 Firmicutes
1443 Betaprot.	1317 Betaprot.	805 Firmicutes
1542 Deltaprot.	1448 Betaprot.	1857 Gammaprot.
1302 Alphaprot.		
1858 Gammaprot.		
Comp. con otras muestras (T6)	Común	Comp. con otros tiempos
471 Bactero.	481 Bactero.	137 Acidob.
1147 Alphaprot.	650 Chloroflexi	
1388 Betaprot.	735 Firmicutes	
1441 Betaprot.	1017 Firmicutes	
1460 Betaprot.	1123 Alphaprot.	
1529 Deltaprot.	1364 Betaprot.	
1558 Deltaprot.	1397 Betaprot.	
	2152 Gammaprot.	

**Tabla 45. OTUs característicos de ANAE160 en cada muestreo.** Datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes* y extraídos de los análisis realizados con la aplicación *MeV* del programa TM4.

De los OTUs característicos de cada muestra y análisis (Tabla 39 a Tabla 45), hemos seleccionado aquellos que son *exclusivos* de cada tipo de tratamiento (Tabla 46). En el suelo control estos OTUs corresponden principalmente a las clases *Acidobacteria\_Gp17* y *Acidobacteria\_Gp25*, *Actinobacteria* y *Deltaproteobacteria*. En las muestras tratadas con 40 t ha<sup>-1</sup> (AE40 y ANAE40) los OTUs exclusivos de cada una de ellas pertenecen sobre todo a las clases *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* (principalmente en AE40), *Deltaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (en AE40). La muestra AE80 presenta una mayor proporción de OTUs de la clase *Bacilli* (filo *Firmicutes*), *Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria*, mientras que unos pocos OTUs de la clase *Actinobacteria* caracterizan ANAE80. La muestra tratada con la mayor dosis de lodo aerobio (AE160) presentó OTUs exclusivos correspondientes principalmente a las clases *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (este último en mayor proporción comparada con las otras muestras), mientras que ANAE160 presenta algunos pocos OTUs exclusivos en gran parte de las clases *Bacilli* y *Clostridia*, y otros del filo *Proteobacteria* (principalmente *Alphaproteobacteria*) (Tabla 46).

Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
122 <i>Acidobacteria_Gp17</i>	239 <i>Actinobacteria</i>	154 <i>Actinobacteria</i>	168 <i>Actinobacteria</i>	170 <i>Actinobacteria</i>	125 <i>Acidobacteria_Gp1</i>	229 <i>Actinobacteria</i>
130 <i>Acidobacteria_Gp25</i>	421 <i>Actinobacteria</i>	334 <i>Actinobacteria</i>	209 <i>Actinobacteria</i>	256 <i>Actinobacteria</i>	241 <i>Actinobacteria</i>	250 <i>Actinobacteria</i>
179 <i>Actinobacteria</i>	1993 <i>Cyanobacteria</i>	360 <i>Actinobacteria</i>	261 <i>Actinobacteria</i>	383 <i>Actinobacteria</i>	287 <i>Actinobacteria</i>	481 <i>Sphingobacteria</i>
188 <i>Actinobacteria</i>	1094 <i>Alphaprot.</i>	454 <i>Bacteroidia</i>	342 <i>Actinobacteria</i>	505 <i>Sphingobacteria</i>	347 <i>Actinobacteria</i>	487 <i>Sphingobacteria</i>
230 <i>Actinobacteria</i>	1120 <i>Alphaprot.</i>	531 <i>Sphingobacteria</i>	488 <i>Sphingobacteria</i>	537 <i>Sphingobacteria</i>	1127 <i>Alphaprot.</i>	674 <i>Deinococci</i>
242 <i>Actinobacteria</i>	1126 <i>Alphaprot.</i>	699 <i>Bacilli</i>	514 <i>Sphingobacteria</i>	1999 <i>Cyanobacteria</i>	1265 <i>Alphaprot.</i>	736 <i>Bacilli</i>
299 <i>Actinobacteria</i>	1164 <i>Alphaprot.</i>	700 <i>Bacilli</i>	533 <i>Sphingobacteria</i>	766 <i>Bacilli</i>	1589 <i>Gammaprot.</i>	751 <i>Bacilli</i>
300 <i>Actinobacteria</i>	1269 <i>Alphaprot.</i>	737 <i>Bacilli</i>	2005 <i>Cyanobacteria</i>	1069 <i>Alphaprot.</i>	1367 <i>Betaprot.</i>	837 <i>Clostridia</i>
346 <i>Actinobacteria</i>	1279 <i>Alphaprot.</i>	792 <i>Bacilli</i>	773 <i>Bacilli</i>	1090 <i>Alphaprot.</i>	1525 <i>Deltaprot.</i>	903 <i>Clostridia</i>
353 <i>Actinobacteria</i>	1842 <i>Gammaprot.</i>	796 <i>Bacilli</i>	927 <i>Clostridia</i>	1099 <i>Alphaprot.</i>	1461 <i>Deltaprot.</i>	956 <i>Clostridia</i>
354 <i>Actinobacteria</i>	1378 <i>Betaprot.</i>	801 <i>Bacilli</i>	1022 <i>Erysipelotrichi</i>	1113 <i>Alphaprot.</i>	1930 <i>Verrucomicrobiae</i>	1137 <i>Alphaprot.</i>
507 <i>Sphingobacteria</i>	1384 <i>Betaprot.</i>	877 <i>Clostridia</i>	1121 <i>Alphaprot.</i>	1079 <i>Alphaprot.</i>	2070 <i>OP10</i>	1243 <i>Alphaprot.</i>
763 <i>Bacilli</i>	1528 <i>Deltaprot.</i>	1095 <i>Alphaprot.</i>	1122 <i>Alphaprot.</i>	1512 <i>Deltaprot.</i>		2152 <i>Gammaprot.</i>
789 <i>Bacilli</i>	1534 <i>Deltaprot.</i>	1104 <i>Alphaprot.</i>	1261 <i>Alphaprot.</i>	1539 <i>Deltaprot.</i>		1369 <i>Betaprot.</i>
1846 <i>Gammaprot.</i>		1136 <i>Alphaprot.</i>	1447 <i>Betaprot.</i>			1540 <i>Deltaprot.</i>
1357 <i>Betaprot.</i>		1139 <i>Alphaprot.</i>	1470 <i>Deltaprot.</i>			
1458 <i>Betaprot.</i>		1149 <i>Alphaprot.</i>	1612 <i>Gammaprot.</i>			
1509 <i>Deltaprot.</i>		1159 <i>Alphaprot.</i>	1614 <i>Gammaprot.</i>			
1532 <i>Deltaprot.</i>		1236 <i>Alphaprot.</i>	1678 <i>Gammaprot.</i>			
1538 <i>Deltaprot.</i>		1254 <i>Alphaprot.</i>	1856 <i>Gammaprot.</i>			
		1276 <i>Alphaprot.</i>				
		1807 <i>Gammaprot.</i>				
		1814 <i>Gammaprot.</i>				
		1861 <i>Gammaprot.</i>				
		1385 <i>Betaprot.</i>				
		1535 <i>Deltaprot.</i>				
		1879 <i>Synergistia</i>				

**Tabla 46. OTUs exclusivos de cada muestra del estudio.** Obtenido mediante la comparación de los OTUs característicos de cada tipo y tiempo de la Tabla 39 a Tabla 45 extraídos de los análisis MeV de los datos proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes*.

Con esta última tabla (Tabla 46) hemos definido una serie de OTUs que son característicos de cada tipo de muestra y que podrían ser utilizados para diferenciar suelos agrícolas poco alterados de otros a los que se han aplicado grandes cantidades de lodos. Sin embargo, ¿podemos reducir todavía más el número de estos OTUs necesarios para simplificar un análisis de este tipo? Analizando los datos globales del

número absoluto de clones hemos podido detectar un grupo muy reducido de OTUs que se presentan en algunas muestras frecuentemente (Tabla 47). Así, los OTUs 136 y 1058 correspondientes a las clases *Acidobacteria\_Gp6* y *Planctomycetacia* son característicos del suelo control, puesto que en las muestras tratadas existe una disminución gradual del número de estos OTUs con el incremento de la dosis de lodo, especialmente el OTU 136 que no fue detectado en ANAE160 (Figura 65 y Figura 66). Los OTUs más característicos en las parcelas tratadas pertenecen principalmente a la clase *Gammaproteobacteria* (1851, 1852 y 1857) observándose la ausencia de uno de ellos (OTU 1857) en el suelo control y un efecto gradual con el incremento de la dosis, sobre todo en AE160 (1857) y en ANAE160 (1851). Dos OTUs correspondientes a la clase *Bacilli* (802 y 803) también son característicos de las parcelas enmendadas, aunque el primero de ellos parece estar más relacionado con aquellas tratadas con lodos aerobios. Otros OTUs (1157, 1396 y 523) son más característicos de estas parcelas alteradas, aunque su número ya comienza a ser más próximo al presente en el suelo control, por lo que habrá que evaluar en el futuro con nuevos datos si la disminución en éste constituye un efecto tóxico del suelo. El OTU 758 de la clase *Bacilli* (filo *Firmicutes*) fue el más representativo de las muestras tratadas con lodo aerobio mientras que el OTU 274 de la clase *Actinobacteria* (), en las parcelas tratadas con lodo anaerobio. Además existen dos OTUs cuya presencia aparentemente no fue alterada por las enmiendas, puesto que presentaron valores similares y que corresponden a las clases *Gemmatimonadetes* (1042) y *Alphaproteobacteria* (1309) (Tabla 47).

Total	Soil	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160	OTU
<b>OTUs característicos de suelo sin tratar</b>								
192	50	34	20	13	48	27	0	136 <i>Acidobacteria_Gp6</i>
91	20	18	11	13	11	10	8	1058 <i>Planctomycetacia</i>
<b>OTUs característicos de parcelas tratadas</b>								
51	0	4	7	23	1	3	13	1857 <i>Gammaprot.</i>
169	1	18	37	35	10	14	54	1851 <i>Gammaprot.</i>
84	1	12	10	16	12	10	23	803 <i>Bacilli</i>
32	1	7	4	4	7	3	6	1157 <i>Alphaprot.</i>
75	3	13	12	14	8	10	15	1852 <i>Gammaprot.</i>
60	3	7	10	12	9	9	10	1396 <i>Betaprot.</i>
63	6	8	15	5	11	8	10	523 <i>Sphingobacteria</i>
50	0	22	3	10	9	1	5	802 <i>Bacilli</i>
<b>OTUs más característicos en parcelas AE</b>								
85	4	12	13	19	17	13	7	758 <i>Bacilli</i>
<b>OTUs más característicos en parcelas ANAE</b>								
116	18	8	9	16	18	16	31	274 <i>Actinobacteria</i>
<b>OTUs presentes en todas y no afectados (aparentemente) por el tratamiento</b>								
135	24	17	12	12	25	16	29	1042 <i>Gemmatimonadetes</i>
84	13	11	12	8	15	17	8	1309 <i>Alphaprot.</i>

**Tabla 47. OTUs más abundantes y característicos en todas las muestras.** Datos extraídos del número absoluto de clones de las muestras, sin normalización proporcionados por el programa *Classify* de *Greengenes*.

### 3.5.4 ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO.

#### 3.5.4.1 RIQUEZA Y DIVERSIDAD DE LAS MUESTRAS.

Con el objetivo de determinar cómo afectaron las distintas dosis y tipos de lodos de depuradora la biodiversidad del suelo, hemos calculado varios índices de riqueza y diversidad de especies que se describen en Materiales y métodos. La riqueza de especies es una manera sencilla de describir la diversidad de la comunidad microbiana (Magurran, 1988). La biodiversidad ha sido definida como el número total de especies presentes y su frecuencia (Zhang y Xu, 2008). Entre los numerosos índices de biodiversidad, hemos seleccionado como métodos paramétricos los índices de *Margalef*, *Shannon*, y recíproco de *Simpson* que están relacionados entre ellos de forma positiva y con el tamaño de la muestra (número de clones) (Poulsen *et al.*, 2012). Como índices de riqueza, hemos seleccionado el índice *Chao1* que es un índice no paramétrico (Magurran, 1988), el índice *Alfa* y el índice *Evenness* que está relacionado con la homogeneidad o equidad de la muestra.

Hemos detectado que la dosis intermedia de lodo aerobio y anaerobio añadida al suelo ( $80 \text{ t ha}^{-1}$ ) incrementó la diversidad y riqueza en especies puesto que presentaron los índices más elevados en gran parte de los muestreos respecto a las otras muestras de nuestro estudio. En algunos muestreos, hemos observado que la riqueza (índice de *Shannon*) de las muestras tratadas con menor dosis de lodo (AE40 y ANAE40) fue similar a lo detectado en las tratadas con dosis intermedias (AE80 y ANAE80) en la mayoría de los muestreos (T0, T1, T2, T3, T5 y T6). Las muestras tratadas con mayor dosis, especialmente la tratada con  $160 \text{ t ha}^{-1}$  de lodo anaerobio (ANAE160), presentaron los menores índices de riqueza y diversidad en una parte importante de los muestreos, indicando que esa dosis ha disminuido la diversidad de especies del suelo. El suelo agrícola control (*Soil*) presentó índices de riqueza y diversidad intermedios y en algunos muestreos fueron los más bajos (T3, T5 y T6) y en otros, los más elevados (T1 y T4).

**Tabla 48. Índices de diversidad de las muestras *SOIL*, AE40, AE80, AE160, ANAE40, ANAE80 y ANAE160 en cada análisis (T0 hasta T6).** Los mayores valores de los índices están destacados en verde, mientras que los menores valores se destacan en rojo.

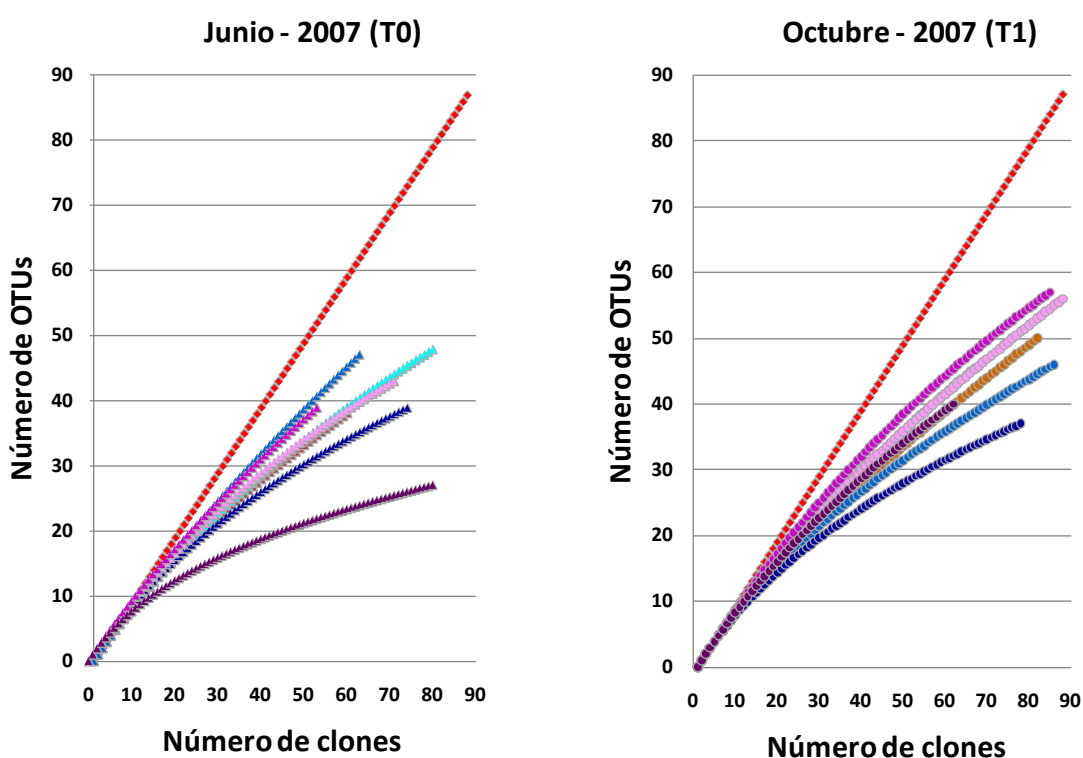


T0	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	59	79	62	74	71	53	80
Número de OTUs	38	48	47	39	43	39	27
Índice de <i>Margalef</i>	9,07	10,76	11,14	8,83	9,85	9,57	5,93
Índice de <i>Shannon</i>	3,43	3,64	3,69	3,39	3,55	3,50	2,85
Índice de <i>Simpson</i>	40,73	45,30	65,20	31,04	40,08	51,03	14,23
<i>Chao1</i>	116,40	116,06	199,10	75,00	76,13	119,08	59,66
<i>Alfa</i>	46,14	51,86	88,25	33,37	46,18	66,65	14,32
<i>Evenness</i>	2,17	2,17	2,21	2,13	2,17	2,20	1,99
T1	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	81	67	85	77	87	84	61
Número de OTUs	50	46	46	37	56	57	40
Índice de <i>Margalef</i>	11,15	10,70	10,13	8,29	12,32	12,63	9,49
Índice de <i>Shannon</i>	3,61	3,62	3,54	3,30	3,79	3,91	3,50
Índice de <i>Simpson</i>	38,11	48,06	36,42	27,34	55,01	89,38	45,75
<i>Chao1</i>	250,00	154,00	114,64	71,57	210,08	120,37	110,08
<i>Alfa</i>	55,67	64,77	40,92	27,98	67,90	77,96	50,49
<i>Evenness</i>	2,12	2,18	2,13	2,10	2,17	2,23	2,18
T2	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	79	78	76	79	76	72	76
Número de OTUs	43	37	46	49	43	43	41
Índice de <i>Margalef</i>	9,61	8,26	10,39	10,98	9,70	9,82	9,24
Índice de <i>Shannon</i>	3,51	3,05	3,65	3,63	3,53	3,61	3,52
Índice de <i>Simpson</i>	38,03	11,41	54,80	45,30	39,58	55,56	45,96
<i>Chao1</i>	88,56	78,14	88,05	100,38	73,72	69,04	82,14
<i>Alfa</i>	38,59	27,54	49,34	48,85	41,01	45,01	36,30
<i>Evenness</i>	2,15	1,94	2,20	2,15	2,16	2,21	2,18
T3	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	53	103	79	84	78	40	69
Número de OTUs	36	50	53	48	52	33	43
Índice de <i>Margalef</i>	8,82	10,57	11,90	10,61	11,71	8,67	9,92
Índice de <i>Shannon</i>	3,45	3,70	3,80	3,67	3,76	3,41	3,53
Índice de <i>Simpson</i>	55,12	48,63	70,02	49,80	52,68	78,00	40,44
<i>Chao1</i>	68,00	72,15	161,64	90,05	106,00	131,00	99,25
<i>Alfa</i>	49,35	38,30	70,53	46,54	68,19	88,46	48,78
<i>Evenness</i>	2,22	2,18	2,20	2,18	2,19	2,25	2,16
T4	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	64	28	40	75	75	63	78
Número de OTUs	46	22	30	43	42	44	37
Índice de <i>Margalef</i>	10,82	6,30	7,86	9,73	9,50	10,38	8,26
Índice de <i>Shannon</i>	3,68	2,94	3,26	3,49	3,53	3,66	3,28
Índice de <i>Simpson</i>	67,19	31,50	45,88	30,16	39,64	75,11	24,02
<i>Chao1</i>	175,60	112,25	102,00	73,72	70,80	104,06	68,50
<i>Alfa</i>	73,26	47,36	54,54	41,91	39,40	64,73	27,54
<i>Evenness</i>	2,21	2,19	2,21	2,14	2,17	2,23	2,09
T5	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	81	83	78	82	88	76	78
Número de OTUs	43	55	46	51	57	54	44
Índice de <i>Margalef</i>	9,56	12,22	10,33	11,35	12,50	12,24	9,87
Índice de <i>Shannon</i>	3,39	3,84	3,50	3,71	3,84	3,88	3,42
Índice de <i>Simpson</i>	23,82	70,89	28,87	51,09	63,80	98,27	25,44
<i>Chao1</i>	95,56	139,50	161,60	187,90	241,90	149,06	117,14
<i>Alfa</i>	37,18	71,11	47,07	57,62	70,05	83,26	41,77
<i>Evenness</i>	2,08	2,21	2,10	2,17	2,19	2,24	2,08
T6	SOIL	AE40	AE80	AE160	ANAE40	ANAE80	ANAE160
Número de clones	77	87	86	76	82	82	78
Número de OTUs	43	53	50	53	50	53	48
Índice de <i>Margalef</i>	9,67	11,64	11,00	12,01	11,12	11,80	10,79
Índice de <i>Shannon</i>	3,40	3,77	3,69	3,71	3,66	3,77	3,51
Índice de <i>Simpson</i>	25,44	55,83	48,09	41,30	42,03	58,26	24,81
<i>Chao1</i>	123,08	108,68	86,96	559,25	118,05	161,64	162,08
<i>Alfa</i>	40,16	57,55	49,91	77,67	54,38	64,84	53,12
<i>Evenness</i>	2,08	2,19	2,17	2,15	2,15	2,19	2,09

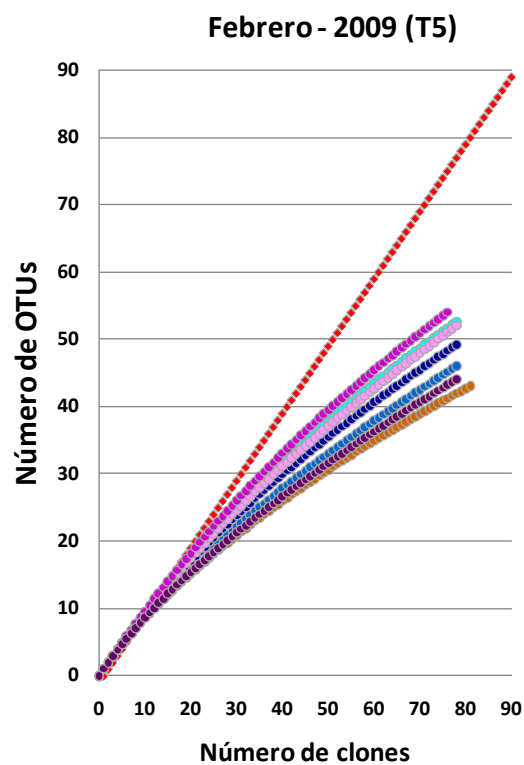
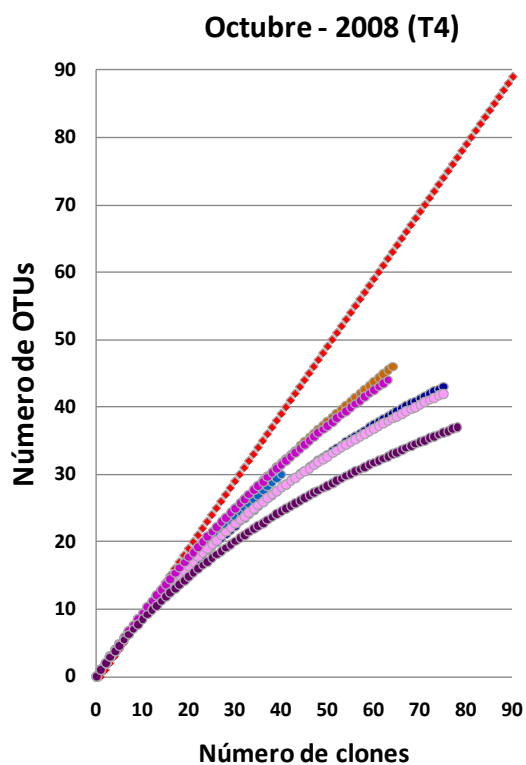
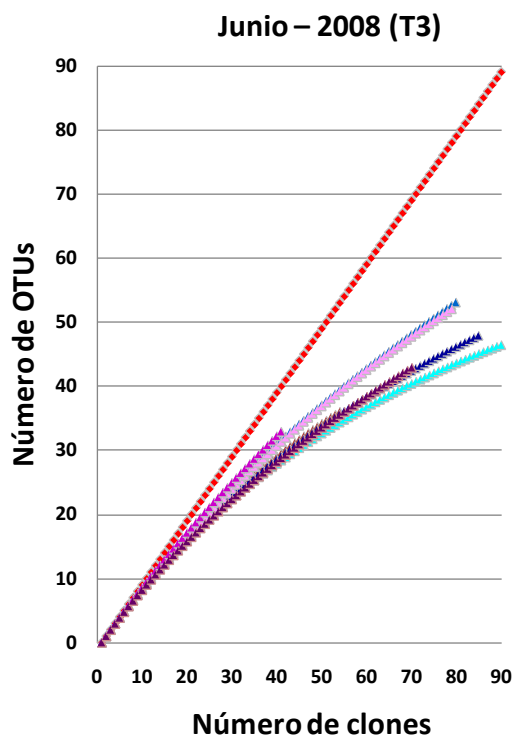
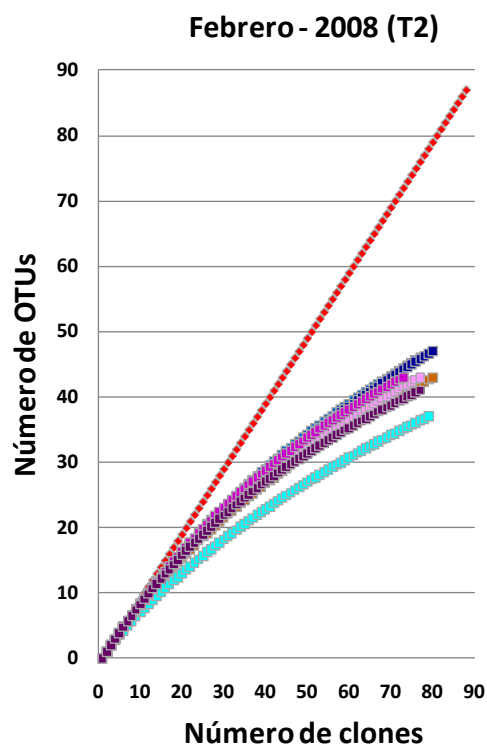
### 3.5.4.2 CURVAS DE RAREFACCIÓN.

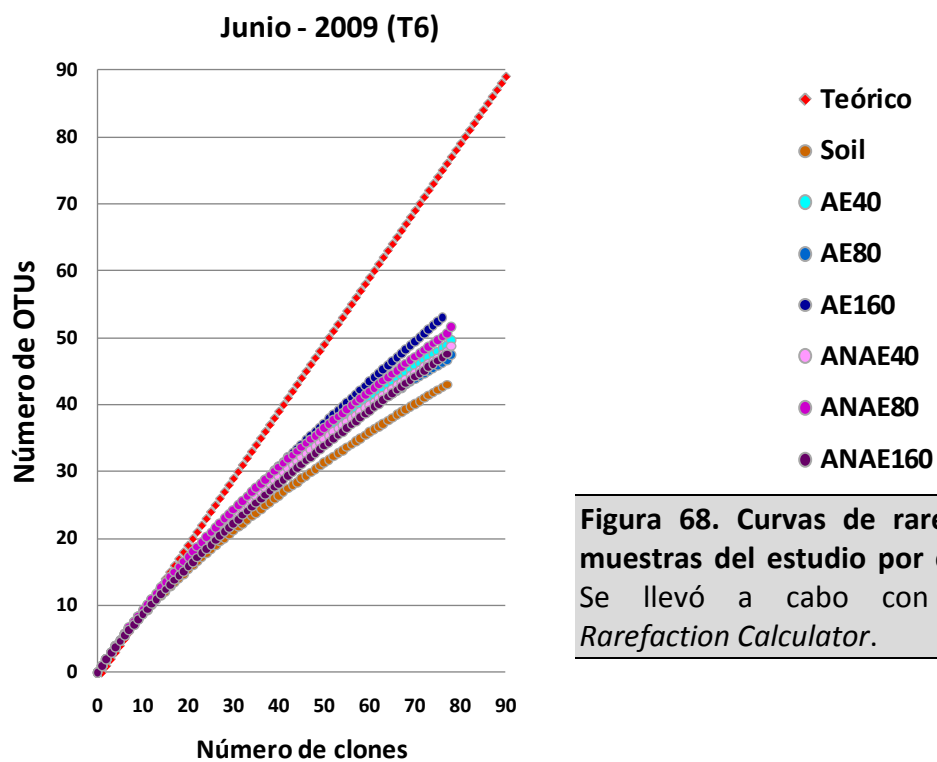
Además de calcular los índices, hemos estimado la riqueza de especies evaluando la representatividad de éstas con el esfuerzo de muestreo aplicado mediante las curvas de rarefacción a través del programa *Rarefaction Calculator* (Figura 68). La curva de rarefacción va a depender de la distribución de las especies y del tamaño de la muestra (Gotelli y Colwell, 2001). El esfuerzo del muestreo se define mediante la pendiente de la curva de rarefacción, puesto que existe un punto en la curva a partir del cual aunque se incremente el número de clones de la muestra, no se incrementará el número de nuevas especies (OTUs) y la curva presentará una pendiente igual a cero o asintótica (Chen *et al.*, 2012). Ese tipo de curva sería la ideal ya que significa que el esfuerzo de muestreo fue suficiente puesto que aunque se analicen más clones no se detectarán nuevas especies.

Como se puede observar en las curvas de rarefacción de nuestras muestras (Figura 68), el esfuerzo de muestreo de la mayoría de éstas fue razonable porque la pendiente de la curva no es la máxima y, por tanto, tiende a ser asintótica en algunos análisis (junio y octubre de 2007 – T0 y T1; febrero de 2008 – T2; febrero y junio de 2009 – T5 y T6). En la muestra de ANAE160 en junio de 2007 (T0) el esfuerzo de muestreo fue mejor puesto que la pendiente se aproxima a cero al final (Figura 68) lo que se podría explicar por la menor riqueza y diversidad de especies que presenta (Tabla 48).









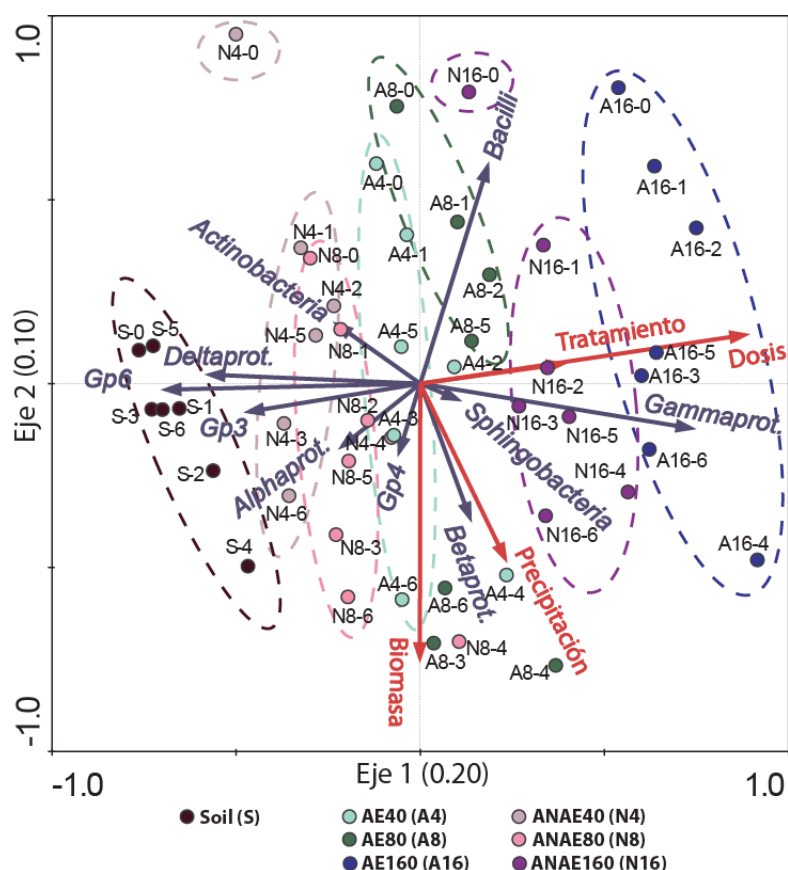
**Figura 68. Curvas de rarefacción de las muestras del estudio por cada muestreo. Se llevó a cabo con el programa *Rarefaction Calculator*.**

### 3.5.5 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES AMBIENTALES EN LA COMPOSICIÓN BACTERIANA CARACTERÍSTICA DE CADA MUESTRA.

Con el objetivo de buscar pautas y tendencias generales en la dinámica de la composición bacteriana de las muestras, así como discernir qué parámetros ambientales podrían influir en la presencia de dichas bacterias, se optó por realizar análisis de ordenación con el programa CANOCO. Para ello, hemos realizado análisis multivariantes directos de gradiente y, en concreto, análisis de redundancia (RDA) en el cual hemos utilizado los siguientes parámetros ambientales: *humedad*, temperatura media de los 3 últimos días (*temperatura*), precipitación acumulada en los tres días previos al muestreo (*precipitación*), *tratamiento* (*Soil*, AE40, AE80, AE160, ANAE40, ANAE80 y ANAE160), *dosis* (0, 40, 80 o 160 t ha<sup>-1</sup>), y *lodo* aplicado (ninguno, aerobio, anaerobio), utilizando como variables explicativas los porcentajes de las clases bacterianas más abundantes en cada muestra (Figura 69). Además, se llevó a cabo un diagrama de ordenación utilizando los valores de las clases menos frecuentes como variables explicativas, sin embargo esa ordenación no proporcionó datos fácilmente interpretables.

La *dosis* de lodo aplicada, la *biomasa*, el *tratamiento* de lodo y la *precipitación* medida en los 3 días precedentes son los que más influyen en composición bacteriana de cada muestra en este orden y explican la ordenación (Figura 69). El eje horizontal de la gráfica expresa un 20 % de la varianza total y está definido en su extremo positivo por el *tratamiento* y la *dosis* de lodo utilizada. Mientras que el eje vertical explica un 10 % de esa varianza y su extremo negativo se define por la *precipitación* y la *biomasa* (Figura 69).

Efectivamente, las mayores *dosis*, *tratamiento* de lodo y *precipitación* tienden a asociarse con muestras con una mayor proporción de las clases *Bacilli* (filo *Firmicutes*), *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*) y *Sphingobacteria* (filo *Bacteroidetes*), aquellas tratadas con mayores dosis de lodo (Figura 69). Las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias de lodo y el suelo control (*Soil*) se agrupan por presentar la mayor proporción de las clases *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*), *Acidobacteria\_Gp6* y *Acidobacteria\_Gp3* (Figura 69), como ya se ha sugerido previamente (Figura 67) y una asociación negativa con el *tratamiento*, la *dosis* y la *precipitación*. En cambio, la *biomasa* se asocia con muestras que presentan las mayores proporciones de las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Acidobacteria\_Gp4* (Figura 69).



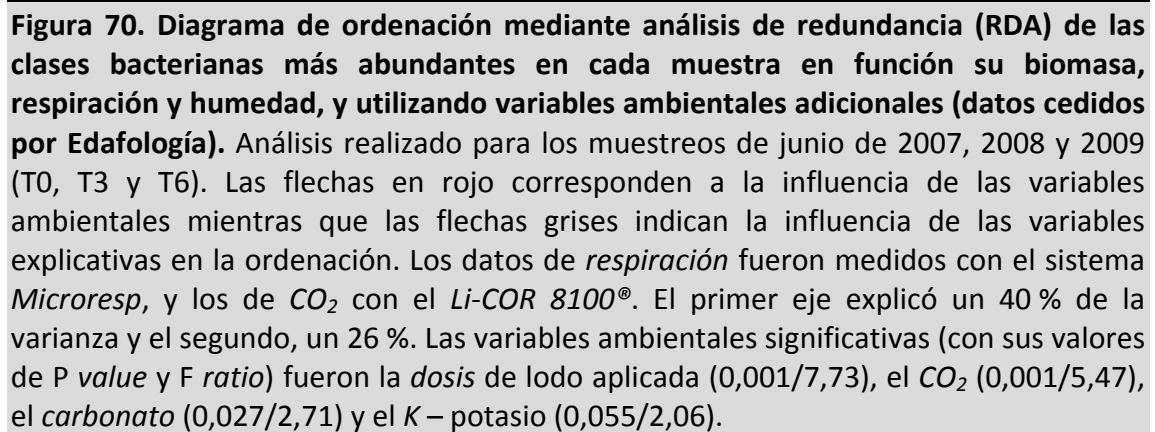
**Figura 69. Diagrama de ordenación mediante análisis de redundancia (RDA) de las clases bacterianas más abundantes en cada muestra en función de su biomasa, precipitación de los 3 días, dosis y tratamiento de lodo utilizado.** Las flechas en rojo corresponden a la influencia de las variables ambientales mientras que las azules indican la influencia de las variables explicativas en la ordenación. *Soil* – S; AE40 – A4; AE80 – A8; AE160 – A16; ANAE40 – N4; ANAE80 – N8; ANAE160 – N16. Los números tras el guión corresponden a los muestreos del estudio (0 - T0, 1 - T1, 2 - T2, 3 - T3, 4 - T4, 5 - T5, 6 - T6). Las leyendas *Alphaprot.*, *Gammaprot.*, *Betaprot.* y *Deltaprot.* corresponden a las clases *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* perteneciente al filo *Proteobacteria*, mientras que *Gp3*, *Gp4* y *Gp6* corresponden a las clases *Acidobacteria\_Gp3*, *Acidobacteria\_Gp4* y *Acidobacteria\_Gp6* pertenecientes al filo *Acidobacteria*. El primer eje explicó un 20 % de la varianza y el segundo, un 10 %. Las variables ambientales significativas (con sus valores de *P value* y *F ratio*) fueron la *dosis* (0,001/8,53), la *biomasa* (0,001/4,60), el *tratamiento* (0,003/3,78) y la *precipitación* (0,036/2,45).

De nuestro trabajo en conjunto con el grupo de Edafología del profesor Casermeiro, existe una serie de propiedades correspondientes a los muestreos de junio de cada año (T0, T3 y T6), que caracterizan el suelo en cada análisis. Éstas son la *humedad*, la *respiración* ( $\text{CO}_2$  - medida con un analizador de gases infrarrojo portátil *Li-COR 8100*®), el contenido en carbono orgánico (en % y en  $\text{g Kg}^{-1}$ ), carbonatos (%), bicarbonatos ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ), carbono soluble (*C sol.* –  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), nitrógeno soluble (*N Sol.* –  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), *Na*, *K*, *Ca*, *Mg*, *pH*, *conductividad* (en  $\text{mS cm}^{-1}$ ), carbono fácilmente

degradable o fracción lábil 1 y 2 (*Lp1*, la más sencilla, y *Lp2*), carbono recalcitrante (*R*), la capacidad de intercambio catiónico (*CIC*) y la relación entre el carbono y el nitrógeno soluble ( $C_{sol}:N_{sol}$ ). Estas propiedades han sido incluidas en los estudios de ordenación de nuestras muestras con el fin de comprobar cuáles son las que más influyen. A priori, algunas variables ambientales influirían menos en este nuevo análisis puesto que los muestreos pertenecen a la misma estación (verano – T0, T3 y T6).

Los parámetros ambientales más influyentes en la composición bacteriana del suelo, biomasa, respiración (medida con el sistema *Microresp*) y humedad son la *dosis* de lodo aplicada, la respiración medida con el *Li-COR 8100*<sup>®</sup> ( $CO_2$ ), el *carbonato* y el potasio - *K* (Figura 29) en este orden. El eje horizontal de la gráfica expresa un 40 % de la varianza total y su extremo positivo está definido por la *dosis* de lodo y la cantidad de *carbonato*. En cambio, el eje vertical explica un 26 % de esta varianza y su extremo positivo se define por la respiración ( $CO_2$ ) y la *dosis* de lodo aplicada (Figura 29).

La ordenación de las muestras y de las clases bacterianas más frecuentes en cada una de ellas en la Figura 29 fue similar a la de la Figura 69, en la que se utilizan menos parámetros ambientales. Hemos observado que la *dosis* de lodo aplicada y el *potasio* (*K*) influyen en la agrupación de las muestras tratadas con dosis elevadas de lodo, las cuales presentan un mayor porcentaje de las clases *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (elipse verde), mientras que la *humedad* y el *carbonato* se asocian con las muestras de los primeros muestreos en las que existe una mayor proporción de secuencias de la clase *Bacilli* (elipse azul) (Figura 29). En cambio, la respiración ( $CO_2$ ) se asocia con las mayores proporciones de *Sphingobacteria* y *Acidobacteria\_Gp4*, con la biomasa, la respiración, y con las muestras tratadas con menores dosis de lodo (elipse morada) (Figura 29).



## 3.6 DISCUSIÓN

---

### 3.6.1 POBLACIONES BACTERIANAS CARACTERÍSTICAS EN UN SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO.

#### 3.6.1.1 POBLACIONES BACTERIANAS MÁS ABUNDANTES EN EL SUELO AGRÍCOLA.

El suelo es un tipo de ecosistema en el cual la diversidad biológica es muy extensa genotípica y fenotípicamente (Øvreås y Torsvik, 1998) ya que en tan solo unos pocos gramos pueden existir varios miles de especies microbianas con funciones metabólicas muy variadas (Torsvik *et al.*, 2002; Gans *et al.*, 2005). Su estudio mediante técnicas moleculares permite comprender los procesos y funciones de ese ecosistema (Chow *et al.*, 2002; Zhang y Xu, 2008; Mishra y Nautiyal, 2009; Wessen *et al.*, 2010) junto con los cambios que pueden ocurrir en la composición de las poblaciones microbianas del suelo (Buckley y Schmidt, 2003) con el fin de utilizarlos como indicadores de la salud, sostenibilidad y estabilidad del suelo (Chen *et al.*, 2012).

En nuestro estudio hemos realizado análisis moleculares basados en la identificación de secuencias del 16S rRNA extraídos de muestras de suelo agrícola mediterráneo. Las poblaciones bacterianas generales encontradas en esas muestras durante los dos años de estudio pertenecen a los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicutes*, como se ha detectado anteriormente en otros suelos agrícolas (Buckley y Schmidt, 2002; Castro *et al.*, 2010). Estos filos constituyen generalmente entre el 80 y el 98 % del total de clones analizados de nuestro suelo agrícola control (*Soil*) variando sus proporciones dependiendo del muestreo, al igual que otros análisis previamente publicados (Youssef *et al.*, 2009). Dentro de esos filos, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* son los más frecuentes y dominantes en general, mientras que *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Plantomycetes* son los menos abundantes (Janssen, 2006).

En nuestro estudio, los filos *Proteobacteria* (*Alpha* y *Betaproteobacteria*), *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes* fueron los más frecuentes en el suelo control (*Soil*), al igual que en otros tipos de suelos agrícolas en EEUU (Buckley y Schmidt, 2001a; Fierer *et al.*, 2007b; Zhang y Xu, 2008) o en suelos tropicales de Brasil (Val-Moraes *et al.*, 2011). De entre los filos más abundantes, *Actinobacteria* es un grupo de bacterias Gram-positivas que ejecuta un importante papel en la metabolización de compuestos orgánicos difícilmente degradables presentes en el suelo como, por ejemplo, la quitina y la celulosa que son degradadas principalmente por las bacterias pertenecientes al orden *Actinomycetales* y al orden *Acidimicrobiales*, siendo esenciales en el ciclo del carbono y en la producción de antibióticos (Furlong *et al.*, 2002; He *et al.*, 2012). Efectivamente, en nuestros resultados, gran parte de las bacterias del filo *Actinobacteria* detectadas en el suelo control, corresponden a la clase *Actinobacteria* y al orden *Actinomycetales*, y además algunos OTUs pertenecientes a esa clase y a ese orden fueron exclusivos en la muestra suelo control en algunos muestreos (188, 230, 242, 299, 300, 346, 353 y 354) (Figura 52, Figura 62 y Figura 64).

Sin embargo, el filo *Proteobacteria* es el de mayor relevancia en el suelo puesto que según la literatura, es el más abundante en estos ecosistemas, presenta una gran diversidad metabólica (Tringe *et al.*, 2005; Janssen, 2006; Roesch *et al.*, 2007; Spain *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012) y es esencial en el ciclo global del carbono, nitrógeno y azufre (Kersters *et al.*, 2006). Las clases del filo *Proteobacteria* más frecuentemente detectadas en el suelo agrícola de nuestro estudio fueron *Alphaproteobacteria*, seguidos de *Beta*, *Delta* y *Gammaproteobacteria* (Figura 33 y Figura 67), al igual que en otros estudios realizados anteriormente (Buckley y Schmidt, 2001a; Janssen, 2006; Kielak *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Spain *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2010; Ros *et al.*, 2011).

Las bacterias del filo *Acidobacteria* (principalmente la clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) constituyen entre un 13 y un 20 % del total de clones analizados en el suelo control y un OTU correspondiente a ese filo (136) fue el más abundante en casi todos los análisis (Figura 34), aunque existen OTUs que fueron exclusivos del suelo control (122 – T0 y 130 – T1), de forma similar a lo detectado previamente en suelos agrícolas (Kielak *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). El 20 % de las secuencias encontradas en diversas genotecas de distintos suelos de varios países correspondió a este filo, por lo que se le considera como uno de los filos más abundante y diverso en suelos agrícolas (Kuske *et al.*, 1997; Dunbar *et al.*, 1999; Janssen, 2006; Ros *et al.*, 2011). Sin embargo, se trata de un grupo de microorganismos especialmente susceptibles a los cambios, como lo demuestra que en suelos intensivamente fertilizados el porcentaje de estas bacterias alcance solamente un 7 % del total (McCaig *et al.*, 1999), cuya presencia disminuye en suelos con alto contenido de nutrientes al tratarse de un grupo eminentemente oligotrófico (Smit *et al.*, 2001).

#### ***¿Las poblaciones bacterianas del suelo control variaron respecto a las estaciones del año y a los parámetros ambientales característicos de cada estación?***

La comunidad microbiana del suelo sufre cambios en su estructura como consecuencia de diversos factores bióticos y abióticos como, por ejemplo, su propia microbiota autóctona, la temperatura, el pH, la humedad y la cantidad de nutrientes (Torsvik y Øvreås, 2002; Roesch *et al.*, 2007; Rousk *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2010; Brockett *et al.*, 2011). En verano, por ejemplo, es posible que las altas temperaturas y la disminución en la disponibilidad de agua provoquen cambios en la estructura de la comunidad microbiana del suelo y en invierno, se supone que las poblaciones microbianas entran en estado de latencia debido a las bajas temperaturas y, como consecuencia, la actividad microbiana disminuye (Roesch *et al.*, 2007; Jangid *et al.*, 2008). Por tanto, es importante aclarar cómo estos parámetros influyen en la comunidad microbiana de un suelo (Torsvik y Øvreås, 2002).

Sin embargo, como hemos observado en las comparaciones realizadas con el programa *Libcompare* (RDP10) entre las muestras de suelo control en cada muestreo y el análisis de los datos proporcionados por *Greengenes* (Figura 34, Tabla 22 a Tabla 28), no parece existir una relación clara entre las estaciones en las que se llevo a cabo cada muestreo y la proporción de las distintas poblaciones de la comunidad bacteriana del suelo. Por el contrario, en un estudio realizado con suelos agrícolas tropicales de Brasil se detectaron diferencias en la composición de las poblaciones bacterianas que fueron atribuidas al efecto de las estaciones de primavera y verano (Val-Moraes *et al.*, 2011). Estas alteraciones fueron sobre todo en la clase *Betaproteobacteria*



(*Proteobacteria*) puesto que sufrió un descenso en verano comparado a los niveles de esas bacterias en primavera (Val-Moraes *et al.*, 2011), aspecto que no sucede en nuestro experimento.

Algunos parámetros ambientales característicos de cada análisis, como por ejemplo la humedad, la temperatura, la textura del suelo y su pH parecen ser los parámetros que ejercen una mayor influencia en la diversidad y riqueza de la comunidad bacteriana del suelo (Smit *et al.*, 2001; Austin *et al.*, 2004; Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Kuramae *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2010; Brockett *et al.*, 2011). En nuestros resultados, la única alteración clara que podría estar asociada con la humedad presente en el suelo fue el incremento de la proporción del filo *Cyanobacteria* (clase *Cyanobacteria*) y de la clase *Deltaproteobacteria* detectada en el suelo control en octubre de 2008 (T4, muestreo caracterizado por alto índice de precipitación y humedad) (Tabla 35, Figura 65 y Figura 66). Además de esa diferencia, en este muestreo hemos detectado en el suelo agrícola control una mayor proporción de OTUs pertenecientes a las clases *Sphingobacteria* (filo *Bacteroidetes*) (472, 528 y 529), *Actinobacteria* (148, 183, 235, 245 y 335) y *Betaproteobacteria* (1324, 1357 y 1364) (Tabla 39). Estudios más prolongados que incluyan un mayor número de muestreos podrían ayudar a resolver esta incógnita aunque es más probable que las relaciones se establezcan con parámetros como la temperatura, la humedad o la precipitación que con esquemas clásicos de estaciones.

### 3.6.2 MODIFICACIONES DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS POR EL USO DE LODOS DE DEPURADORA EN SUELOS AGRÍCOLAS MEDITERRÁNEOS.

#### 3.6.2.1 VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN BACTERIANA DEL SUELO TRAS LA ADICIÓN DE LODOS DE DEPURADORA.

El uso de fertilizantes orgánicos en suelos agrícolas tiene como objetivo incrementar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas y mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo (Marmo, 2008) y, al mismo tiempo, reducir la aplicación de fertilizantes inorgánicos que podrían ser más perjudiciales para el suelo (Hargreaves *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso de estos residuos puede afectar de forma importante y causar cambios permanentes en la microbiota autóctona del suelo (Marschner *et al.*, 2003; Enwall *et al.*, 2005; Jangid *et al.*, 2008; Poulsen *et al.*, 2012).

En nuestro trabajo hemos podido comprobar que cuanto mayor fue la dosis aplicada, mayor fue la alteración en las poblaciones bacterianas del suelo. Los filos bacterianos más afectados fueron *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. El filo *Proteobacteria* fue el que sufrió una mayor alteración en los suelos por el tratamiento y la dosis de lodo aplicada (incremento de la clase *Gammaproteobacteria* y disminución de *Alphaproteobacteria*) sobre todo las parcelas tratadas con las mayores cantidades (Figura 69 y Figura 29). El filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*, géneros *Bacillus* y *Planococcus*) también sufrió un incremento por la adición de los lodos, sobre todo en los primeros muestreos del estudio. Los filos *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (*Acidobacteria\_Gp6*, *Gp6*) fueron los que presentaron una mayor disminución en su proporción, sobre todo en este último en las parcelas tratadas que incluso, desapareció en AE160 y ANAE160 en los primeros muestreos (Figura 42 y Figura 48). Hemos observado estas alteraciones incluso dos años después de la aplicación y, sobre todo, en las parcelas tratadas con mayor dosis de lodo aerobio y anaerobio. Sin embargo, en las tratadas con dosis bajas y intermedias de lodos hemos observado que a lo largo del tiempo, las proporciones de las poblaciones bacterianas han ido asemejándose a las encontradas en el suelo control (*Soil*), a excepción de que en AE80 todavía hemos detectado una mayor proporción de la clase *Gammaproteobacteria* (género *Luteimonas*), y un descenso del filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) y *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*) en los últimos muestreos del estudio (T4, T5 y T6) (Tabla 29).

Esas alteraciones en la comunidad bacteriana del suelo, principalmente en las parcelas tratadas con mayores dosis de lodo aerobio y anaerobio, fueron similares a las publicadas por otros autores, en las que se detectó una disminución significativa del filo *Acidobacteria* y un incremento importante del filo *Proteobacteria* en suelos tratados con distintos tipos de compost (Ros *et al.*, 2011), con altas concentraciones de nitrógeno (Fierer *et al.*, 2012) o con otros tipos de fertilizantes orgánicos (McCaig *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2010). La proporción del filo *Acidobacteria* disminuyó en suelos agrícolas tratados con estiércol animal frente a suelos tratados con fertilizantes químicos (Ge *et al.*, 2008). Las diferencias en los niveles de estos dos filos parecen reflejar variaciones en el pH, en la composición de la materia orgánica o en la textura del suelo (Lauber *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2010). El incremento inicial,

específicamente de los filos *Firmicutes* (clase *Bacilli*, género *Bacillus* y *Planococcus*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*, género *Flavisolibacter*) fue similar al efecto producido en el suelo por distintos residuos orgánicos e inorgánicos (Poulsen *et al.*, 2012), con estiércol animal (Ge *et al.*, 2008) y en suelos tratados con 24 t ha<sup>-1</sup> de lodos de depuradora (Val-Moraes *et al.*, 2011). Efectivamente, las bacterias del filo *Firmicutes* presentan un crecimiento rápido cuando existe una gran cantidad de nutrientes en el suelo (Atlas y Bartha, 2002) y las bacterias del filo *Bacteroidetes* se caracterizan por degradar polímeros presentes en el suelo como, por ejemplo, celulosa, quitina y pectina (Kirchman, 2002).

**¿Los lodos realmente han influido en la población bacteriana del suelo por su composición microbiana? Y además, ¿han influido de forma positiva o negativa en la microbiota autóctona del suelo?**

Los microorganismos procariotas como las bacterias presentes en los lodos son responsables del metabolismo de los nutrientes de las aguas residuales y muchos de ellos han sido aislados, caracterizados e identificados (Wagner *et al.*, 2002; Chouari *et al.*, 2005). En los lodos utilizados en nuestro estudio, las poblaciones bacterianas más comunes pertenecen a los filos *Firmicutes* (clases *Clostridia* y *Bacilli*), *Proteobacteria* (clases *Alpha*, *Beta* y *Gammaproteobacteria*), *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*), *Actinobacteria* (clase *Actinobacteria*, orden *Actinobacteridae* principalmente en el lodo aerobio) y *Chloroflexi* (clase *Anaerolineae*, orden *Anaerolineales*) (Figura 35 y Figura 36), siendo este último más frecuente en el lodo anaerobio, como se ha descrito en digestores anaeróbicos (Chouari *et al.*, 2005; Rivière *et al.*, 2009). Las bacterias del filo *Chloroflexi* son componentes importantes de la comunidad microbiana del lodo anaerobio (Chouari *et al.*, 2005) y están implicadas en la degradación de compuestos químicos recalcitrantes, como el tolueno y el 1,2-dicloropropano, en diversos consorcios anaeróbicos, sobre todo las pertenecientes al orden *Anaerolineales* (Ficker *et al.*, 1999; Schlotelburg *et al.*, 2000). Las bacterias del filo *Firmicutes* (sobre todo las de la clase *Clostridia*, género *Bacillus*), las más abundantes en los lodos, son importantes en la digestión aeróbica termofílica de estos residuos, puesto que aumentan la eficiencia de ese proceso por la producción de una proteasa termoestable (Liu *et al.*, 2011b). En cuanto al filo *Proteobacteria*, las clases *Alpha* y *Betaproteobacteria* fueron las más abundantes en el lodo aerobio, mientras que *Alpha* y *Gammaproteobacteria* en el lodo anaerobio, al igual que en diversos digestores anaeróbicos (Chouari *et al.*, 2005).

La predominancia de todos estos filos bacterianos en los lodos podría ser explicada por la presencia de sustratos orgánicos complejos que esas bacterias son capaces de degradar, además de macromoléculas hidrocarbonadas como pectina, celulosa o quitina, proteínas y diversas sustancias xenobióticas (Chouari *et al.*, 2005). Otros filos bacterianos detectados en los lodos como, por ejemplo, *Synergistetes* (OTU 1876, presente en menos de 1 % en los lodos), *OP10* (OTU 2070, 3,88 % en el lodo anaerobio) y una mayor proporción de *TM7* en el lodo aerobio (OTU 2161, 8,61 %) (Figura 35 y Figura 36) también fueron encontrados en digestores anaeróbicos aunque en pequeñas proporciones y son considerados como raros (Rivière *et al.*, 2009).

La influencia de los lodos de depuradora en la microbiota del suelo se tradujo inicialmente en el incremento en la proporción del filo *Firmicutes* (clase *Bacilli*) en los primeros muestreos en las parcelas tratadas, aunque ese efecto se diluyó a lo largo de

los análisis. Además, hemos detectado que algunos OTUs pertenecientes al filo *Firmicutes* (792, 796, 801, 815, 837, 877, 903 y 1022) aparecen principalmente en el primer muestreo (junio de 2007, T0) en las muestras tratadas con dosis intermedias y altas de lodos de depuradora (Figura 52) y algunos OTUs correspondientes a ese filo presentes en el lodo (OTUs 758, 770 y 969) fueron detectados en las muestras tratadas de una forma habitual hasta el final del ensayo (Figura 50). Así, los cambios observados en la comunidad bacteriana podrían estar relacionados con la introducción de microorganismos procedentes del lodo y como consecuencia, explicar el incremento de la diversidad y riqueza sobre todo en la parcela tratada con 80 t ha<sup>-1</sup> de lodo anaerobio (ANAE80) que presentó los mayores índices en gran parte de los muestreos (Tabla 48). La adición de fertilizantes a los suelos agrícolas incrementa la biodiversidad tanto cuando se usan distintos tipos de fertilizantes orgánicos (Mäeder *et al.*, 2002; Poulsen *et al.*, 2012), en suelos agrícolas comparados con suelos de bosque (Upchurch *et al.*, 2008) o suelos tratados con estiércol animal (Sun *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2008), como cuando se usan fertilizantes inorgánicos (a base de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, pentóxido de fósforo y K<sub>2</sub>O, óxido de potasio) (Ge *et al.*, 2008).

En cambio, las grandes cantidades de lodos aplicadas al suelo (160 t ha<sup>-1</sup>) disminuyeron la diversidad y riqueza en especies, principalmente de la parcela tratada con mayor dosis de lodo anaerobio (ANAE160) en una parte importante de los muestreos (Tabla 48). La muestra tratada con mayor dosis de lodo aerobio (AE160) presentó estos índices más disminuidos solamente en octubre de 2007 (T1), y algunos más elevados en T2 y T6 comparada con el resto de las muestras (Tabla 48). Esta disminución de la biodiversidad observada sobre todo en ANAE160, podría ser atribuida a varias razones. Una de ellas podría ser explicada por la aplicación de una gran cantidad de lodo que provoca una banalización en composición de la microbiota bacteriana del suelo, lo que se traduce en una menor diversidad y explicaría que el muestreo inicial (T0) sea más completo (Figura 68). Además, hemos comprobado que solamente 4 OTUs pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (clases *Alpha* y *Beta*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*) diferencian a ANAE160 del resto de las muestras del primer muestreo (Figura 50). Otra de las razones que hemos sugerido previamente, podría ser la introducción de una gran cantidad de microorganismos procedentes de los lodos. Sin embargo, hemos observado que solo unos pocos OTUs son compartidos entre los lodos originales y las muestras tratadas con las mayores dosis en el primer muestreo de nuestro estudio (T0) (Figura 50), indicando que los microorganismos del lodo han influido solo parcialmente en la microbiota del suelo tratado. De hecho, en las parcelas enmendadas se han detectado secuencias pertenecientes a los filos *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* que no hemos detectado en los lodos, a pesar de haber sido identificadas previamente en digestores anaeróbicos (Briée *et al.*, 2007). Quizá los lodos no hayan influido de forma más patente en la composición bacteriana de las parcelas enmendadas debido a que las bacterias presentes en ellos no son capaces de soportar y adaptarse a las condiciones del suelo. Los pocos OTUs que son similares entre los lodos y las muestras de las parcelas enmendadas pertenecen principalmente al filo *Firmicutes* (758, 770, 874 y 969) y *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* – 1130 y 1138; y *Betaproteobacteria* – 1387) (Figura 50), aunque algunos de ellos fueron detectados incluso en el suelo control (OTUs 758, 874 y 969 – *Firmicutes*, clases *Bacilli* y *Clostridia*, OTU 1387 – *Betaproteobacteria*), indicando que esas bacterias también pueden formar parte de la microbiota autóctona del suelo.

agrícola (Figura 34). La detección de las clases *Bacilli* (género *Bacillus*, OTU 758) y *Clostridia* (orden *Clostridiales*, OTU 874 y 969) en el suelo agrícola control puede estar asociada a la capacidad de esas bacterias de producir esporas que son formas de resistencia que permiten su supervivencia en el suelo durante largos periodos de tiempo. Una última explicación, y quizá la más plausible, podría ser que esa gran cantidad de lodo utilizado introdujo una gran cantidad de materia orgánica en el suelo que pudo estimular más la microbiota copiotrófica que la oligotrófica, como hemos comentado en el Capítulo II.

La menor diversidad de las muestras tratadas con mayor dosis, sobre todo ANAE160, podría deberse a cambios fisicoquímicos producidos por la aplicación de los lodos. Por ejemplo, hemos observado que cuanto mayor fue la dosis aplicada menor fue el pH del suelo, el cual se ha descrito como un factor muy influyente en la diversidad microbiana de éste (Fierer y Jackson, 2006). En las parcelas tratadas con la mayor dosis de lodo el pH descendió, aunque esa disminución no fue demasiado acusada, debido probablemente a la presencia de carbonatos que tamponaron esa bajada (Jorge y Casermeiro, comunicación personal), lo que justificaría la relación encontrada de esas muestras con los carbonatos en el análisis de RDA utilizando los datos del grupo de Edafología (Figura 29). En general, los suelos agrícolas parecen presentar una menor diversidad bacteriana que la de un suelo prístino (Chen *et al.*, 2012), al igual que ocurre en suelos arenosos de Noruega sometidos a labranza frente a pastizales con alto contenido de materia orgánica (histosol) (Øvreås y Torsvik, 1998) o en suelos tratados con fertilizantes inorgánicos (nitrato amónico) (Jangid *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2010). Las técnicas de rotación de cultivos pueden llevar a una inestabilidad de la comunidad microbiana del suelo (McLaughlin y Mineau, 1995) que se caracteriza por la dominancia de unos pocos microorganismos y, como consecuencia, una disminución de la diversidad (Atlas, 1984). Sin embargo, el cultivo de estos suelos debe ejercer una influencia importante en el mantenimiento de una microbiota suficientemente amplia como para responder a los cambios ambientales, lo que justificaría que exista una mayor riqueza microbiana en suelos cultivados frente a suelos abandonados durante años (Kuramae *et al.*, 2010) o frente a suelos de bosque (Roesch *et al.*, 2007), o suelos enmendados con estiércol animal (Jangid *et al.*, 2008).

#### ***De entre los grupos bacterianos, ¿cuáles fueron los más afectados por la adición de los lodos de depuradora?***

Nuestros resultados indican que existe principalmente una disminución del filo *Acidobacteria* y un incremento del filo *Proteobacteria* en los suelos tratados con lodos a mayores dosis. Esas alteraciones pueden ser debidas a que estos filos bacterianos son algunos de los más abundantes en el suelo (Janssen, 2006; Youssef y Elshahed, 2009; Castro *et al.*, 2010; Ros *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012) y, por tanto, son también los más susceptibles de sufrir alteraciones.

En cuanto a la proporción del filo *Proteobacteria*, la clase *Gammaproteobacteria* fue la más incrementada y la clase *Alphaproteobacteria*, la más disminuida, principalmente en los suelos tratados con mayor dosis de lodos. Este resultado se asemeja a lo que se ha descrito previamente en suelos de clima tropical tratados con lodos de depuradora (Val-Moraes *et al.*, 2011) o en suelos enmendados con residuos compostados (Poulsen *et al.*, 2012). En concreto, la utilización de fertilizantes como enmiendas agrícolas incrementa la proporción de la clase

*Gammaproteobacteria* (Jangid *et al.*, 2008), siendo la clase más abundante en suelos de alta productividad (Niederberger *et al.*, 2008).

El filo *Acidobacteria* es un grupo oligotrófico muy abundante en suelos de pH ácido (inferiores a 6), secos y con baja concentración de nutrientes (Sait *et al.*, 2006; Fierer *et al.*, 2007a; Castro *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2010), por lo que se cultivan mejor en medios oligotróficos y a bajas concentraciones de oxígeno (Stevenson *et al.*, 2004). Estos aspectos justificarían que tras la adición de los lodos de depuradora se detecte una menor proporción de este grupo en el suelo, sobre todo a mayor dosis por la gran cantidad de materia orgánica añadida.

Estas alteraciones podrían justificarse por la gran cantidad de nutrientes añadida al suelo. Las dosis elevadas de lodo parecen relacionarse con una serie de muestras que presentan un mayor número de secuencias del filo *Proteobacteria* (clase *Gammaproteobacteria*), mientras que las parcelas de suelo control o las tratadas con menores dosis de lodo en los últimos muestreos presentan una mayor proporción de secuencias del filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*) (Figura 69 y Figura 29), en concreto del OTU 136 (Figura 34, Figura 39, Figura 41, Figura 46 y Figura 47). Algunos autores han sugerido que la relación existente entre los filos *Proteobacteria* y *Acidobacteria* puede servir como indicador de la condición nutricional del suelo. Según la literatura, cuanto menor es esa *ratio*, menor es la cantidad de nutrientes presentes en el suelo (Smit *et al.*, 2001). Cuando los suelos tienen concentraciones bajas de nutrientes o una gran cantidad de sustratos recalcitrantes, el porcentaje de *Acidobacteria* es alto, mientras que el de *Proteobacteria* es bajo (McCaig *et al.*, 1999; Smit *et al.*, 2001). En cada muestreo de nuestro trabajo, la relación *Proteobacteria:Acidobacteria* presenta valores elevados en las muestras AE160 (entre 0,85 y 1,00), ANAE160 (0,83 - 1,00) mientras que las tratadas con dosis bajas e intermedias de lodos aerobio y anaerobio presentan menores valores (AE40: 0,74 - 0,93; AE80: 0,78 - 0,96; ANAE40: 0,68 - 0,91; ANAE80: 0,76 - 0,90), comparado con los valores en el suelo control (*Soil*) (0,60 - 0,78) (Figura 71). Cuando se analizan globalmente los datos de cada tratamiento, hemos observado que esa *ratio* sigue la misma tendencia, puesto que nuevamente AE160 y ANAE160 presentaron los mayores valores, seguidos de AE80, AE40, ANAE80 y ANAE40, y, por último, el suelo control (*Soil*) (Tabla 49). Por lo tanto, a la vista de estos valores, se podría concluir que los suelos tratados con lodos de depuradora disponen de una mejor condición nutricional que el suelo sin tratamiento, puesto que la *ratio Proteobacteria:Acidobacteria* fue más elevada en los suelos tratados, sobre todo cuando se aplicaron las mayores dosis. Según la literatura, la relación *Proteobacteria:Acidobacteria* es baja en suelos oligotróficos (0,16) (Kuske *et al.*, 1997; Dunbar *et al.*, 1999), intermedia en suelos con baja cantidad de materia orgánica (0,46) (Smit *et al.*, 2001) y alta en suelos agrícolas con una gran cantidad de materia orgánica (0,87) (McCaig *et al.*, 1999) o tratados con distintos tipos de residuos compostados ( $12,6 \times 10^3$  kg compost ha<sup>-1</sup>) (0,82 - 0,75) (Ros *et al.*, 2011).

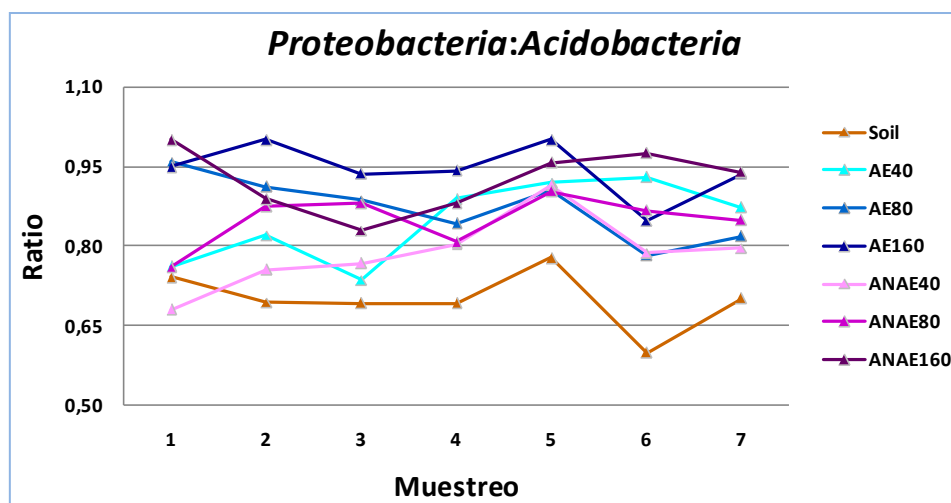


Figura 71. Relación entre *Proteobacteria:Acidobacteria* de las muestras *Soil*, *AE40*, *AE80*, *AE160*, *ANAE40*, *ANAE80* y *ANAE160* (Smit *et al.*, 2001).

<i>Soil</i>	<i>AE40</i>	<i>AE80</i>	<i>AE160</i>	<i>ANAE40</i>	<i>ANAE80</i>	<i>ANAE160</i>
0,70	0,86	0,87	0,94	0,78	0,85	0,92

Tabla 49. Relación *Proteobacteria:Acidobacteria* total de las muestras *Soil*, *AE40*, *AE80*, *AE160*, *ANAE40*, *ANAE80* y *ANAE160*.

Esa diferencia respecto a las bacterias de los filos *Acidobacteria* y *Proteobacteria* en los suelos tratados con lodos frente al suelo control (*Soil*), se podría atribuir, además, a los distintos porcentajes de humedad en las muestras. En nuestros resultados, ese porcentaje fue más elevado en los suelos tratados con lodos de depuradora en la mayoría de los muestreos (Figura 7) comparado con el suelo control (*Soil*). Al mismo tiempo, hemos detectado que el incremento de la humedad y de la precipitación se asoció con el incremento del filo *Proteobacteria* (clase *Gammaproteobacteria*), pero con una disminución con el filo *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*) (Figura 69 y Figura 29). Por tanto, parece existir una cierta relación entre la humedad y la presencia de *Gammaproteobacteria* y *Acidobacteria* en el suelo, ya que ha sido sugerido previamente que las bacterias correspondientes al filo *Acidobacteria* se adaptan fácilmente a suelos secos y oligotróficos con pequeñas cantidades de carbono (Fierer *et al.*, 2007a), mientras que las bacterias del filo *Proteobacteria* se adaptan mejor a ambientes húmedos (Castro *et al.*, 2010).

Aunque hemos detectado un cambio notable en los filos y clases pertenecientes a los grupos más abundantes, existe una idea en este campo que sugiere que las variaciones se podrían manifestar más fácilmente en una serie de grupos poco frecuentes o en los denominados raros por su escasa presencia. La aparición o cambio en las proporciones de estos microorganismos poco frecuentes o raros podría ser una respuesta rápida a diversas variaciones estacionales como, por ejemplo, cambios de la temperatura del suelo, del pH, de la exposición a la luz y del nivel de nutrientes (Elshahed *et al.*, 2008). En nuestro caso, los filos detectados en una menor proporción en los suelos son *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*, al igual que anteriormente en otros estudios llevados a cabo con

suelos agrícolas mediterráneos (Ros *et al.*, 2010). El filo *Gemmatimonadetes* corresponde a aproximadamente un 2 % de la comunidad bacteriana del suelo (Janssen, 2006), aunque en nuestras muestras de suelo agrícola control alcanzó un 9,88 % en algunos muestreos (Figura 33), siendo más elevada en febrero de 2009 (T5), mientras que en las muestras tratadas con lodos esa proporción alcanzó su valor máximo en ANAE160 (8,97 %) (Figura 48). Hemos detectado diferencias significativas en la proporción del filo *Gemmatimonadetes*, en diversos análisis en muestras de lodo aerobio (Tabla 35). Sin embargo, el OTU 1042 correspondiente a ese filo (clase *Gemmatimonadetes*, orden *Gemmatimonadales*) fue detectado en casi todos los muestreos en todas las muestras, principalmente en aquellas tratadas con dosis bajas e intermedias y en ANAE160, y fue uno de los OTUs menos alterados por la adición de los lodos (Tabla 47). Sin embargo, no podemos justificar el incremento de estas bacterias en suelos enmendados en nuestro estudio porque las bacterias pertenecientes a ese filo han sido detectadas en mayores proporciones en suelos agrícolas de climas árido y semiárido (Jangid *et al.*, 2008; Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Mendez *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Cary *et al.*, 2010) y en desiertos (Chanal *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008), y se adaptan mejor a ambientes secos con bajo índice de humedad (DeBruyn *et al.*, 2011).

En el suelo control la proporción del filo *Verrucomicrobia* fue muy baja y ocasional, encontrándose en mayor medida en las parcelas enmendadas, aunque no superó el 3,53 % del total. A pesar de ser frecuente en suelos agrícolas (hasta un 10 %) (Buckley y Schmidt, 2001b; Janssen, 2006) también es abundante en suelos de praderas y pastizales (Bergmann *et al.*, 2011). pero aún no se conoce claramente su función en los ecosistemas (Rocha *et al.*, 2010).

Además de estos filos bacterianos menos abundantes, hemos detectado algunos filos que correspondieron a una ínfima proporción del total de clones analizados siendo casi indetectables en algunos análisis, como *BRC1*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospira*, *Synergistetes*, *TM7* y *OP10*. Existe poca información respecto al origen, composición, dinámica y funciones en el medio ambiente de los filos raros presentes en el suelo (Elshahed *et al.*, 2008). En los lodos de depuradora utilizados en nuestro estudio hemos detectado una gran cantidad de este tipo de filos bacterianos. De entre ellos, *Chloroflexi* (sobre todo en el lodo anaerobio), *TM7* (en el lodo aerobio), *Bacteroidetes* y *OP10*, fueron los más frecuentes y se encuentran habitualmente en los lodos de depuradora, reservorios de agua y sedimentos variados (Miura *et al.*, 2007; Briée *et al.*, 2007). La influencia de la adición de enmiendas orgánicas al suelo en estos filos no está clara, pero en nuestro caso, hemos comprobado una considerable disminución de uno de ellos (*Cyanobacteria*, clase *Cyanobacteria*) respecto al suelo control (*Soil*) en las muestras de suelo tratadas con lodos de depuradora (AE160 y lodo anaerobio), en octubre de 2008 – T4 (Tabla 35), de manera similar a otro estudio realizado con suelos tratados con residuos compostados (Poulsen *et al.*, 2012). El filo *Cyanobacteria* es típico en ambientes muy húmedos (de los Ríos *et al.*, 2004) y se podría atribuir la menor proporción de ese filo a la introducción de materia orgánica al suelo, puesto que según algunos autores, eso podría afectar negativamente a las poblaciones autotróficas como los filos *Chloroflexi* y *Cyanobacteria* (He *et al.*, 2012).



Además de los filos raros existen bacterias en el suelo de las que también se desconoce su función y el filo al que pudieran pertenecer. Una explicación para la presencia de esas bacterias podría residir en que la diversidad bacteriana del suelo es tan extensa, que todavía no se ha podido identificar todos los tipos existentes. Generalmente estas bacterias están depositadas en las bases de datos como "*Unclassified Bacteria*". En nuestro estudio hemos detectado que una pequeña proporción del total correspondió a ese tipo de bacterias (en algunas muestras hasta en un 17 %). La presencia de esas "bacterias no-clasificadas" en el suelo no es infrecuente, puesto que han sido descritas en un 6 % del total de las secuencias en suelos de climas tropicales (Val-Moraes *et al.*, 2011), un 12 % en suelos holandeses (Kielak *et al.*, 2008) o incluso, un 13,7 % en suelos agrícolas (Poulsen *et al.*, 2012) y un intervalo entre un 10,4 % y un 19,4 % en suelos de bosque y tratados con distintos tipos de fertilizantes (Jangid *et al.*, 2008).

Como resumen podríamos decir que en nuestro trabajo hemos detectado una gran cantidad de alteraciones en las proporciones de las poblaciones bacterianas en los suelos tratados con lodos de depuradora que son dependientes de la cantidad y tipo de lodo y que tras un periodo prolongado tienden a desaparecer cuando se usan dosis bajas. Sin embargo, los resultados publicados previamente son muy variables. Así, mientras que algunos autores no detectan alteraciones en suelos tratados con residuos obtenidos por compost utilizando técnicas basadas en DGGE (Crecchio *et al.*, 2004), otros autores al igual que nosotros, encuentran diferencias muy importantes en la microbiota de suelos tratados con lodos de depuradora aunque posteriormente sean atribuidas al bajo pH en este suelo (Enwall *et al.*, 2007). Las diferencias entre estos trabajos y nuestro estudio podrían residir en la utilización de métodos distintos de identificación de la microbiota bacteriana del suelo (DGGE y TRFLP) (Crecchio *et al.*, 2004; Enwall *et al.*, 2007) o de residuos orgánicos distintos a los nuestros (residuos compostados frente a lodos de depuradora de aguas residuales), por lo que sería conveniente establecer modelos comunes de estudio que permitieran una mayor contrastabilidad de los datos.

### 3.6.2.2 ¿ALGUNOS OTUS DE ESPECIES BACTERIANAS PODRÍAN SERVIR COMO MARCADORES DE LA ALTERACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA DEL SUELO?

La presencia de poblaciones características del suelo control que pertenecen primordialmente a la clase *Actinobacteria* junto con una pequeña proporción perteneciente a las clases *Acidobacteria*, *Bacilli*, *Sphingobacteria*, *Beta*, *Delta* y *Gammaproteobacteria* (Tabla 46) permitiría definir un corpus mínimo de secuencias que fuéramos capaces de utilizar para definir el estado de un suelo. La descripción de esos “grupos mínimos” nos permitiría fabricar un sistema que nos pudiera detectar los cambios que se producen en las poblaciones del suelo frente a diversas alteraciones de una manera rápida y fácil mediante micromatrices (*microarrays*) que recogen gran cantidad de secuencias del gen 16S rRNA para diversos filos bacterianos presentes en el suelo como han descrito otros autores (DeSantis *et al.*, 2007; Val-Moraes *et al.*, 2011; Kuramae *et al.*, 2012).

En las muestras tratadas con lodos, hemos observado que algunos de los OTUs que pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*), que fue la más incrementada en AE160 (1612, 1614, 1678 y 1856) (Tabla 46), permitieron diferenciar esa muestra de las otras, y podrían servir como indicadores de la alteración de la composición bacteriana del suelo al añadir dosis tan altas de lodo aerobio. Otros OTUs de esa misma clase fueron exclusivos de algunas muestras como en AE80 (1807, 1814 y 1861) y solamente un único OTU de esa clase estaban presentes en las muestras ANAE80 (1589), ANAE160 (2152), AE40 (1842) y el suelo control (1846).

Las clases *Alphaproteobacteria* y *Bacilli* también fueron unas de las más alteradas por la adición de los lodos, puesto que muchos OTUs correspondientes a ellas fueron exclusivos de las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias, sobre todo en AE80. Hemos detectado, además, una mayor proporción de la clase *Sphingobacteria* (filo *Bacteroidetes*) principalmente en las muestras AE160, ANAE40 y ANAE160 comparadas con el suelo control (Tabla 46), como se ha detectado anteriormente en suelos fertilizados (Nemergut *et al.*, 2008). La presencia de una mayor proporción de OTUs de la clase *Bacilli* (filo *Firmicutes*) en las muestras tratadas en los primeros muestreos (Tabla 46) podría indicar el cambio inicial de la composición bacteriana del suelo por la adición de los lodos. Otros OTUs de las clases *Bacilli* y *Clostridia* (filo *Firmicutes*) también fueron exclusivos de ANAE160 (Tabla 46). Las elevadas proporciones de las clases *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia* y *Sphingobacteria* han sido también detectadas en suelos tratados con 3 y 24 t ha<sup>-1</sup> de lodos de depuradora (Val-Moraes *et al.*, 2011).

Además de todas esas clases, el filo *Acidobacteria* fue otro de los grupos bacterianos más alterados por la adición de lodos a los suelos, encontrándose en menor proporción principalmente en las muestras tratadas con las mayores dosis. Esa alteración se comprueba con la aparición de algunos OTUs de ese filo exclusivamente en el suelo control (122 y 130), existiendo solamente un OTU exclusivo de ese filo (125) en ANAE80. Además, el OTU 136 (*Acidobacteria*\_Gp6) es el más abundante en el suelo control y se encuentra en menor proporción en las parcelas con enmiendas, observándose una disminución gradual de esa clase con el incremento de la dosis de lodo aplicada (Figura 66). La clase *Actinobacteria* podría proporcionar OTUs selectivos

del estado del suelo puesto que pocos de ellos fueron exclusivos de las parcelas enmendadas en comparación con el suelo control (Tabla 46). Un ejemplo interesante del uso de OTUs de estos dos grupos para diferenciar cambios en los suelos es la detección de la disminución de las secuencias del filo *Actinobacteria* y la ausencia de OTUs del filo *Acidobacteria* que sucede en el suelo cuando se imitan condiciones relacionadas con el cambio climático como es el incremento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> ambientales (He *et al.*, 2012).

Por tanto, de la misma manera que se han utilizado micromatrices para describir alteraciones de diverso tipo en el suelo, nuestros resultados podrían ser utilizados para el diseño de una micromatriz específica que comprobara la evolución de las poblaciones microbianas tras la adición de los lodos de depuradora lo que nos permitiría evaluar el uso de determinados residuos como fertilizantes agrícolas.

### 3.7 CONCLUSIONES

---

- En el suelo agrícola control los filos bacterianos más frecuentes fueron *Proteobacteria* (clases *Alpha* y *Betaproteobacteria*), *Actinobacteria* y *Acidobacteria*, que se mantuvieron relativamente constante en casi todos los análisis, a excepción de la variación detectada en la proporción de los filos *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* y la clase *Betaproteobacteria* influidos, sobre todo, por la precipitación característica de un muestreo. Los filos menos abundantes fueron *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Verrucomicrobia*.
- Las dosis bajas e intermedias modificaron las poblaciones bacterianas del suelo en los primeros muestreos principalmente los filos *Firmicutes* (clase *Bacilli*), *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*) y *Proteobacteria* (clases *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*), aumentando la diversidad y riqueza de especies del suelo. Sin embargo, a lo largo del tiempo la composición de las poblaciones bacterianas de la mayoría de esas muestras se asemejaron a la del suelo agrícola control.
- La aplicación de la mayor dosis de lodos de depuradora ( $160 \text{ t ha}^{-1}$ ) modificó de manera muy importante la población bacteriana del suelo incrementando las poblaciones de los filos *Proteobacteria* (clases *Gamma* y *Alphaproteobacteria*) y disminuyendo las de *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*, género *Gp6*), *Firmicutes* (clase *Bacilli*) y *Bacteroidetes* (clase *Sphingobacteria*).
- Los lodos de depuradora influyeron en la población bacteriana del suelo introduciendo algunas bacterias del filo *Firmicutes* (clases *Clostridia* y *Bacilli*) de manera temporal pero, primordialmente, por la introducción de una gran cantidad de nutrientes que estimuló el crecimiento de la propia microbiota autóctona del suelo.
- El tratamiento y la dosis de lodo aplicada fueron los parámetros que más influyeron en la proporción de los filos bacterianos, seguidos de la precipitación, del carbonato y del potasio (K).
- Algunos OTUs pertenecientes a las clases *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* y al filo *Acidobacteria* pueden servir de marcadores para detectar la alteración en la composición bacteriana del suelo por la adición de lodos de depuradora, sobre todo a dosis muy elevadas ( $160 \text{ t ha}^{-1}$ ), mientras que algunos OTUs de los filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Beta* y *Deltaproteobacteria* podrían ser utilizados como marcadores característicos del suelo agrícola mediterráneo.



## **CAPÍTULO IV**

### **4. Reflexión Final.**



Nuestro estudio se ha basado en identificar las propiedades microbiológicas y poblaciones bacterianas características de un suelo agrícola mediterráneo y la alteración que se produce en estos parámetros tras la aplicación de distintas dosis y tipos de lodos de depuradora. La utilización de los lodos como enmiendas agrícolas es una forma de reciclar estos residuos (Franco-Hernandez *et al.*, 2003; Grøn *et al.*, 2007; Gomez-Rico *et al.*, 2008; Diacono y Montemurro, 2010) y su uso puede influir positiva o negativamente en diversos aspectos del suelo. De entre ellos, la mejora de sus propiedades físico-químicas (capacidad de almacenamiento de agua, estructura, estabilidad de agregados, de entre otros), el incremento de la actividad microbiana y de los procesos biogeoquímicos realizados por los microorganismos son los más frecuentemente estudiados (Ros *et al.*, 2003; Bastida *et al.*, 2007a; Tejada *et al.*, 2009). Sin embargo, su uso también puede dar lugar a efectos negativos como, por ejemplo, la introducción de patógenos fecales (United States Environmental Protection Agency, 1995; Grøn *et al.*, 2007; Lang y Smith, 2007), bacterias o genes de resistencia a antibióticos que pueden persistir en el suelo (Gaze *et al.*, 2008; Kümmerer, 2008; Hölzel *et al.*, 2010) o el incremento de la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Paramasivam *et al.*, 2008; Fernández-Luqueño *et al.*, 2009; Mattana *et al.*, 2010).

En este trabajo hemos comprobado que el aumento de la dosis de lodo aplicada al suelo provoca una disminución de la biomasa y la respiración, seguida de un incremento de los recuentos de microorganismos oligotróficos, copiotróficos, hongos, bacterias patógenas fecales y resistentes a ampicilina, manteniéndose elevados incluso dos años después de su aplicación. Además, las dosis más elevadas de lodo modificaron la proporción de diversas poblaciones bacterianas del suelo, sobre todo las de los filos *Proteobacteria* (clase *Gammaproteobacteria*) y *Acidobacteria* (clase *Acidobacteria\_Gp6*) aumentando el estado nutricional del suelo, pero disminuyendo su diversidad y riqueza en especies (principalmente al usar la mayor dosis de lodo anaerobio – ANAE160).

La aplicación de dosis más bajas de lodos (40 y 80 t ha<sup>-1</sup>) produjo el efecto contrario. La biomasa y la respiración aumentaron, incrementándose la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (sobre todo la dosis más baja de lodo aerobio), mientras que los recuentos de los microorganismos analizados fueron menores comparados con las parcelas tratadas con mayor dosis. Sin embargo, esas dosis modificaron la proporción de las poblaciones bacterianas del suelo solamente en los primeros análisis volviendo gradualmente a una composición bacteriana similar a la detectada en el suelo agrícola control.

Además, podríamos sugerir que los lodos de depuradora casi no introdujeron nuevos microorganismos al suelo, puesto que fueron pocas las especies procedentes de los lodos aplicados las detectadas en las parcelas tratadas. La mayor parte de los OTUs detectados en los lodos utilizados pertenecen a los filos *Firmicutes* y su incidencia en la población de las parcelas enmendadas no trasciende más allá de los primeros análisis. A nuestro juicio, estos residuos han influido principalmente por la introducción de una gran cantidad de nutrientes al suelo (sobre todo las mayores dosis de lodo aplicadas), estimulando el metabolismo de ciertos grupos bacterianos presentes en él como, por ejemplo, los microorganismos copiotróficos. Así, procesos de fermentación debidos al exceso de nutrientes similares al efecto *Crabtree*, podrían ser llevados a cabo (Pronk *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2006). El grupo bacteriano más



incrementado en el suelo por la adición de la mayor dosis de lodo fue la clase *Gammaproteobacteria* que se compone en gran medida de bacterias de metabolismo fermentativo (Bergey y Holt, 1994) como las enterobacterias (familia *Enterobacteriaceae*) en las que ha sido detectado anteriormente el efecto *Crabtree* (Mustea y Muresian, 1967).

Sin embargo, no solamente los lodos han modificado la población bacteriana del suelo. En nuestros resultados, algunas variables ambientales como la humedad, precipitación, temperatura, biomasa y la respiración influyeron tanto en los recuentos de microorganismos como en la composición bacteriana del suelo agrícola. Efectivamente, la temperatura (Zogg *et al.*, 1997), la humedad (Bossio *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 2004; Lang y Smith, 2007; Zorzghi *et al.*, 2010), el pH (Fierer *et al.*, 2007b; Lauber *et al.*, 2008) o la textura del suelo (Lauber *et al.*, 2008) son parámetros que podrían ocasionar cambios en la comunidad microbiana del suelo. De entre esas variables, la precipitación ocurrida en octubre de 2008 (T4) presumiblemente influyó en el cambio en la composición de los filos *Proteobacteria* (*Betaproteobacteria*), *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (*Sphingobacteria*), puesto que algunos OTUs de estos grupos bacterianos aparecieron solamente en ese muestreo.

Así, uno de los objetivos futuros de nuestro trabajo, además de detectar los cambios producidos en la composición de las poblaciones microbianas tras la adición de lodos, sería la utilización de determinados OTUs característicos como indicadores de la alteración del suelo. En nuestros resultados, hemos observado que los OTUs más alterados por la adición de los lodos pertenecieron principalmente a los filos *Proteobacteria* (principalmente la clase *Gammaproteobacteria*), *Acidobacteria* (*Acidobacteria\_Gp7* y *Acidobacteria\_Gp25*), *Actinobacteria* y *Firmicutes* (clase *Bacilli*). Estos OTUs podrían ser utilizados como marcadores en sistemas automatizados como micromatrices específicas (*microarrays*) para detectar cambios de forma rápida y eficaz en la comunidad microbiana del suelo tras la adición de estos residuos. De hecho, ya se han utilizado estos sistemas para detectar cambios en la microbiota de suelos sometidos a determinadas técnicas de cultivo y a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> (He *et al.*, 2012), con enmiendas de lodos de depuradora (Val-Moraes *et al.*, 2011) o contaminados con arsénico (Xiong *et al.*, 2010).

Todos los resultados que mostramos en este trabajo indican la importancia de la evaluación del uso de los lodos de depuradora como enmiendas en suelos agrícolas, sobre todo, el tipo y la dosis a ser utilizada, puesto que pueden causar efectos nocivos en la comunidad microbiana del suelo que pueden ser permanentes y afectar finalmente a la salud humana y ambiental. La presencia de patógenos fecales en las parcelas tratadas con mayor dosis incluso tras dos años de la aplicación de los lodos, puede ocasionar serios problemas para la salud humana. En España, no existe legislación nacional sobre el límite máximo de microorganismos patógenos que puede existir en este tipo de productos. Solamente la Junta de Andalucía ha desarrollado un Real Decreto en el que se indican los parámetros microbiológicos de fertilizantes elaborados con residuos y otros compuestos orgánicos (Real Decreto 824/2005). En él se indica que no se debe detectar *Salmonella* en 25 g de producto elaborado y que la cantidad de *Escherichia coli* no debe superar 10<sup>3</sup> NMP·g<sup>-1</sup> de producto elaborado (REAL DECRETO 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes., 2005). El Plan Nacional Integrado de Residuos (2007 - 2015) establece que es preciso eliminar o

disminuir la cantidad de microorganismos patógenos en los lodos de depuradora para su utilización como enmienda agrícola pero no proporciona límites máximos del número de microorganismos que pudieran tener (Secretaría de Estado de Cambio Climático, 2009). En otros países europeos, como Francia sí existe una normativa específica. Se trata de la norma NFU 44-095:2006, que establece los niveles máximos que pueden presentar una serie de microorganismos en los lodos de depuradora y productos utilizados en fertilización agraria dependiendo del tipo de vegetal a cultivar (hortalizas u otro tipo de vegetales). De entre estos microorganismos, por un lado se consideran a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y enterococos como microorganismos indicadores, y por otro lado, *Lysteria monocytogenes* y *Salmonella* spp como patógenos. Los niveles de estos microorganismos son mucho más exigentes en los suelos destinados a cultivos de hortalizas que el resto de los otros cultivos y, en general, no deben superar  $10^3$  CFUs por gramo de materia bruta.

Sin embargo, además de estas comprobaciones en el material de partida, sería necesario estudiar y comprobar cómo estos fertilizantes orgánicos afectan no solo a las propiedades fisicoquímicas del suelo, si no a su biodiversidad mediante la unión de técnicas moleculares y dependientes de cultivo. Actualmente aún no existen protocolos ni recomendaciones que aborden este aspecto, por lo que sería necesario elaborar manuales de utilización de lodos como enmiendas en suelos agrícolas y desarrollar herramientas que permitan llevar a cabo estudios microbiológicos apropiados para comprobar la composición de estos residuos y su posible influencia en el suelo. Un ejemplo sería la posible utilización de los OTUs bacterianos identificados en nuestro trabajo como marcadores de la alteración de los suelos como consecuencia de la utilización de los lodos de depuradora.



## **5. Bibliografía.**



- Current protocols in molecular biology* (1993). Ausubel FM, Kingston RE, Brent R, Moore DD, Seldman JG, Smith JA y Struhl K (Eds.) Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, USA.
- REAL DECRETO 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial del Estado*, **171**: 25592-25669.
- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19*. (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute (Ed.) Wayne, PA.
- Aarestrup FM (2005) Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **96**: 271-281.
- Acosta-Martínez V, Dowd S, Sun Y y Allen V (2008) Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 2762-2770.
- Alam MZ, Ahmad S y Malik A (2011) Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, **178**: 281-291.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J y Handelsman J (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Micro*, **8**: 251-259.
- Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A y Handelsman J (2008) Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J*, **3**: 243-251.
- Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N y Mackie RI (2001) Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 22-32.
- Amlinger F, Gotz B, Dreher P, Geszti J y Weissteiner C (2003) Nitrogen in biowaste and yard waste compost: dynamics of mobilisation and availability - a review. *European Journal of Soil Biology*, **39**: 107-116.
- Ashby MN, Rine J, Mongodin EF, Nelson KE y Dimster-Denk D (2007) Serial analysis of rRNA genes and the unexpected dominance of rare members of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, **73**: 4532-4542.
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ y Weightman AJ (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 7724-7736.
- Atlas RM (1984) Diversity of microbial communities. *Advances in Microbial Ecology*, **7**: 1-47.
- Atlas RM (2004). *Handbook of microbiological media*. Parks LC (Ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Atlas RM y Bartha R (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Prentice Hall, Madrid, España.
- Austin AT, Yahdjian L, Stark JM, Belnap J, Porporato A, Norton U, Ravetta DA y Schaeffer SM (2004) Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, **141**: 221-235.
- Baker GC, Smith JJ y Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, **55**: 541-555.

- Balba MT, Al-Daher R, Al-Awadhi N, Chino H y Tsuji H (2001) Bioremediation of oil-contaminated desert soil: The Kuwaiti experience. *Environment International*, **24**: 163-173.
- Baquero F y Cantón R (2009). Evolutionary biology of drug resistance. En Springer (Ed.), *Antimicrobial drug resistance: mechanisms of drug resistance*. Humana Press.
- Barajas-Aceves M y Dendooven L (2001) Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. *Bioresour Technol*, **77**: 121-130.
- Barajas-Aceves M, Vera-Aguilar E y Bernal MP (2002) Carbon and nitrogen mineralization in soil amended with phenanthrene, anthracene and irradiated sewage sludge. *Bioresour Technol*, **85**: 217-223.
- Bardgett RD, Anderson JM, Behan-Pelletier V, Brussaard L, Coleman DC, Ettema C, Moldenke A, Schimel JP y Wall DH (2001) The influence of soil biodiversity on hydrological pathways and the transfer of materials between terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems*, **4**: 421-429.
- Bastida F, Kandeler E, Moreno JL, Ros M, Garcia C y Hernandez T (2008) Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, **40**: 318-329.
- Bastida F, Moreno JL, Garcia C y Hernandez T (2007a) Addition of urban waste to semiarid degraded soil: Long-term effect. *Pedosphere*, **17**: 557-567.
- Bastida F, Moreno JL, Hernández T y García C (2007b) The long-term effects of the management of a forest soil on its carbon content, microbial biomass and activity under a semi-arid climate. *Applied Soil Ecology*, **37**: 53-62.
- Bastida F, Perez-Mora A, Babic K, Hai B, Hernandez T, Garcia C y Schlöter M (2009) Role of amendments on N cycling in Mediterranean abandoned semiarid soils. *Applied Soil Ecology*, **41**: 195-205.
- Bell C, McIntyre N, Cox S, Tissue D y Zak J (2008) Soil microbial responses to temporal variations of moisture and temperature in a chihuahuan desert grassland. *Microb Ecol*, **56**: 153-167.
- Bergey DH y Holt JG (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins (Ed.) Baltimore, USA.
- Bergmann GT, Bates ST, Eilers KG, Lauber CL, Caporaso JG, Walters WA, Knight R y Fierer N (2011) The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**: 1450-1455.
- Bhattacharyya P, Chakrabarti K y Chakraborty A (2005) Microbial biomass and enzyme activities in submerged rice soil amended with municipal solid waste compost and decomposed cow manure. *Chemosphere*, **60**: 310-318.
- Binh CT, Heuer H, Gomes NC, Kotzerke A, Fulle M, Wilke BM, Schlöter M y Smalla K (2007) Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiol Ecol*, **62**: 290-302.
- Bitton G (2005a). Introduction to wastewater treatment. *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, pp. 213-223.
- Bitton G (2005b). *Wastewater microbiology*. Wiley & Sons, Gainesville, Florida, USA.

- Blanco G, Lemus JA y Grande J (2009) Microbial pollution in wildlife: Linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed coudons. *Environ Res*, **109**: 405-412.
- Blanco H y Lal R (2010). *Principles of soil conservation and management*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Bloem J, Hopkins DW y Benedetti A (2006). *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI Pub, England, UK.
- Boer W, Folman LB, Summerbell RC y Boddy L (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*, **29**: 795-811.
- Bossio DA, Scow KM, Gunapala N y Graham KJ (1998) Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, **36**: 1-12.
- Bot A y Benites J (2005). *The importance of soil organic matter: key to drought-resistant soil and sustained food production*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Bridge P y Spooner B (2001) Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil*, **232**: 147-154.
- Bri e C, Moreira D y López-García P (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, **158**: 213-227.
- Brockett BFT, Prescott CE y Grayston SJ (2011) Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, **44**: 9-20.
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK y Vivanco JM (2008) Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 738-744.
- Brooks JP, Gerba CP y Pepper IL (2007a) Diversity of aerosolized bacteria during land application of biosolids. *J Appl Microbiol*, **103**: 1779-1790.
- Brooks JP, Maxwell SL, Rensing C, Gerba CP y Pepper IL (2007b) Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Can J Microbiol*, **53**: 616-622.
- Buckley D y Schmidt T (2001a) The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*, **42**: 11-21.
- Buckley DH y Schmidt TM (2001b) Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *Fems Microbiology Ecology*, **35**: 105-112.
- Buckley DH y Schmidt TM (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, **5**: 441-452.
- Buckley DH y Schmidt TS (2002). Exploring the diversity of soil - a microbial rainforest. En Reysenbach AL (Ed.), *Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*. Wiley, New York, USA, pp. 183-208.
- Buscot F y Varma A (2005). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, Germany.
- Buscot F (2005). What are soils? En Varma,A. and Buscot,F. (Eds.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, Germany, pp. 3-17.



- Byappanahalli M y Fujioka R (2004) Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Science and Technology*, **50**: 27-32.
- Calbrix R, Barray S, Chabrerie O, Fourrie L y Laval K (2007) Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. *Applied Soil Ecology*, **35**: 511-522.
- Campbell BJ, Polson SW, Hanson TE, Mack MC y Schuur EAG (2010) The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environmental Microbiology*, **12**: 1842-1854.
- Campbell CD, Chapman SJ, Cameron CM, Davidson MS y Potts JM (2003) A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 3593-3599.
- Carbonell G, Pro J, G ímez N, Babín MM, Fernández C, Alonso E y Tarazona JV (2009) Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 1309-1319.
- Cary SC, McDonald IR, Barrett JE y Cowan DA (2010) On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nat Rev Micro*, **8**: 129-138.
- Castro HF, Classen AT, Austin EE, Norby RJ y Schadt CW (2010) Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Appl Environ Microbiol*, **76**: 999-1007.
- Catricala CE, Bowden WB, Smith CT y McDowell WH (1996) Chemical characteristics of leachate from pulp and paper mill residuals used to reclaim a sandy soil. *Water Air and Soil Pollution*, **89**: 167-187.
- Chakraborty A, Chakrabarti K, Chakraborty A y Ghosh S (2011) Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, **47**: 227-233.
- Chanal A, Chapon V, Benzerara K, Barakat M, Christen R, Achouak W, Barras F y Heulin T (2006) The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental Microbiology*, **8**: 514-525.
- Chander K y Brookes PC (1991) Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **23**: 927-932.
- Chen XB, Su YR, He XY, Wei YW, Wei WX y Wu JS (2012) Soil bacterial community composition and diversity respond to cultivation in Karst ecosystems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **28**: 205-213.
- Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J y Sghir A (2005) Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*, **7**: 1104-1115.
- Chow ML, Radomski CC, McDermott JM, Davies J y Axelrood PE (2002) Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *Fems Microbiology Ecology*, **42**: 347-357.

- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM y Tiedje JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res*, **33**: D294-D296.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM y Tiedje JM (2007) The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucl Acids Res*, **35**: D169-D172.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM y Tiedje JM (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res*, **37**: D141-D145.
- Conklin AR (2005). *Introduction to soil chemistry: analysis and instrumentation*. John Wiley and Sons, England, UK.
- Cools D, Merckx R, Vlassak K y Verhaegen J (2001) Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*, **17**: 53-62.
- Cornwell DA (2002). Gestión de residuos de las plantas de tratamiento de agua. En Letterman, R.D. (Ed.), *Calidad y tratamiento del agua. Manual de suministros de agua comunitaria*. McGraw Hill-American Water Works Association, Madrid, España, pp. 997-1048.
- Crecchio C, Curci M, Pizzigallo MDR, Ricciuti P y Ruggiero P (2004) Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, **36**: 1595-1605.
- D'Costa VM, Griffiths E y Wright GD (2007) Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol*, **10**: 481-489.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW y Wright GD (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science*, **311**: 374-377.
- Dahlberg C, Bergstrom M y Hermansson M (1998) *In situ* detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 2670-2675.
- Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD y Church GM (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, **320**: 100-103.
- Davies J (2006) Are antibiotics naturally antibiotics? *J Ind Microbiol Biotech*, **33**: 496-499.
- de las Heras J, Mañas P y Labrador J (2005) Effects of several applications of digested sewage sludge on soil and plants. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, **40**: 437-451.
- de los Ríos A, Ascaso C, Wierzbos J, Fernández-Valiente E y Quesada A (2004) Microstructural characterization of Cyanobacterial mats from the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 569-580.
- De Nobili M, Contin M, Mondini C y Brookes PC (2001) Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**: 1163-1170.
- de Paz JM, Sanchez J y Visconti F (2006) Combined use of GIS and environmental indicators for assessment of chemical, physical and biological soil degradation in a Spanish Mediterranean region. *Journal of Environmental Management*, **79**: 150-162.
- Debosz K, Petersen SO, Kure LK y Ambus P (2002) Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Applied Soil Ecology*, **19**: 237-248.

- DeBruyn JM, Nixon LT, Fawaz MN, Johnson AM y Radosevich M (2011) Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 6295-6300.
- Delong EF y Pace NR (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic Biology*, **50**: 470-478.
- Demanèche S, Sanguin H, Poté J, Navarro E, Bernillon D, Mavingui P, Wildi W, Vogel TM y Simonet P (2008) Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 3957-3962.
- DeSantis TZ, Brodie EL, Moberg JP, Zubieta IX, Piceno YM y Andersen GL (2007) High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microbial Ecology*, **53**: 371-383.
- DeSantis TZ, Jr., Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsen N, Piceno YM, Phan R y Andersen GL (2006) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucl Acids Res*, **34**: W394-W399.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P y Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 5069-5072.
- Diacono M y Montemurro F (2010) Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **30**: 401-422.
- Dighton J (2003). *Fungi in ecosystem processes*. CRC Press, New Jersey, USA.
- Dunbar J, Takala S, Barns SM, Davis JA y Kuske CR (1999) Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 1662-1669.
- Elshahed MS, Youssef NH, Spain AM, Sheik C, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Roe BA, Davis JP, Schloss PD, Bailey VL y Krumholz LR (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 5422-5428.
- Entry JA y Farmer N (2001) Movement of coliform bacteria and nutrients in ground water flowing through basalt and sand aquifers. *J Environ Qual*, **30**: 1533-1539.
- Enwall K, Nyberg K, Bertilsson S, Cederlund H, Stenström J y Hallin S (2007) Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**: 106-115.
- Enwall K, Philippot L y Hallin S (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 8335-8343.
- Eriksson E, Christensen N, Ejbye Schmidt J y Ledin A (2008) Potential priority pollutants in sewage sludge. *Desalination*, **226**: 371-388.
- Estrada IB, Aller A, Aller F, Gomez X y Moran A (2004) The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresour Technol*, **93**: 191-198.
- Faegri A, Torsvik VL y Goksøyr J (1977) Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol Biochem*, **9**: 105-112.
- Falkowski PG, Fenchel T y Delong EF (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, **320**: 1034-1039.

- Fan H, Fairley DJ, Christopher R, Pepper IL y Wang G (2006) Identification of similar non-thermophilic Crenarchaeota in four Chinese and American pristine soils. *Biodiversity Science*, **14**: 181-187.
- Feng Y, Motta AC, Reeves DW, Burmester CH, van Santen E y Osborne JA (2003) Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**: 1693-1703.
- Fenlon DR, Ogden ID, Vinten A y Svoboda I (2000) The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symposium Series - Society for Applied Bacteriology*, 149s-156s.
- Fernández JM, Hernández D, Plaza C y Polo A (2007) Organic matter in degraded agricultural soils amended with composted and thermally-dried sewage sludges. *Science of the Total Environment*, **378**: 75-80.
- Fernández-Luqueño F, Reyes-Varela V, Martínez-Suárez C, Reynoso-Keller RE, Méndez-Bautista J, Ruiz-Romero E, López-Valdez F, Luna-Guido ML y Dendooven L (2009) Emission of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O from soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) fertilized with different N sources. *Science of the Total Environment*, **407**: 4289-4296.
- Ficker M, Krastel K, Orlicky S y Edwards E (1999) Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 5576-5585.
- Fierer N, Allen AS, Schimel JP y Holden PA (2003a) Controls on microbial CO<sub>2</sub> production: a comparison of surface and subsurface soil horizons. *Global Change Biology*, **9**: 1322-1332.
- Fierer N, Bradford MA y Jackson RB (2007a) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**: 1354-1364.
- Fierer N y Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 626-631.
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA y Knight R (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *Isme Journal*, **6**: 1007-1017.
- Fierer N, Morse JL, Berthrong ST, Bernhardt ES y Jackson RB (2007b) Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology*, **88**: 2162-2173.
- Fierer N y Schimel JP (2002) Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biol Biochem*, **34**: 777-787.
- Fierer N, Schimel JP y Holden PA (2003b) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol Biochem*, **35**: 167-176.
- Fortin N, Fulthorpe RR, Allen DG y Greer CW (1998) Molecular analysis of bacterial isolates and total community DNA from kraft pulp mill effluent treatment systems. *Can J Microbiol*, **44**: 537-546.
- Franco-Hernandez O, Mckelligan-Gonzalez AN, Lopez-Olguin AM, Espinosa-Ceron F, Escamilla-Silva E y Dendooven L (2003) Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus in soil amended with irradiated, pasteurized and limed biosolids. *Bioresour Technol*, **87**: 93-102.
- Franco-Otero VG, Soler-Rovira P, Hernandez D, Lopez-de-Sa EG y Plaza C (2012) Short-term effects of organic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil. *Biology and Fertility of Soils*, **48**: 205-216.

- Furlong MA, Singleton DR, Coleman DC y Whitman WB (2002) Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 1265-1279.
- Fytili D y Zabaniotou A (2008) Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **12**: 116-140.
- Gallert C, Fund K y Winter J (2005) Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**: 106-112.
- Gans J, Wolinsky M y Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309**: 1387-1390.
- García C y Hernández T (1996) Influence of salinity on the biological and biochemical activity of a calciorthid soil. *Plant Soil*, **178**: 255-263.
- García-Gil JC, Plaza C, Senesi N, Brunetti G y Polo A (2004) Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biology and Fertility of Soils*, **39**: 320-328.
- García-Gil JC, Plaza C, Soler-Rovira P y Polo A (2000) Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 1907-1913.
- Garrec N, Picard-Bonnaud F y Pourcher AM (2003) Occurrence of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **35**: 275-283.
- Gaze W, O'Neill C, Wellington E y Hawkey P (2008) Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. *Adv Appl Microbiol*, **63**: 249-280.
- Ge Y, Zhang JB, Zhang LM, Yang M y He JZ (2008) Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China. *Journal of Soils and Sediments*, **8**: 43-50.
- Gerba CP y Bitton G (1994). Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater. *Groundwater pollution microbiology*. Krieger Publishing Company, Malabar, India, pp. 65-88.
- Gerba CP y Smith JE, Jr. (2005) Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual*, **34**: 42-48.
- Ghosh S y LaPara TM (2007) The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J*, **1**: 191-203.
- Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA y Giger W (2001) Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in solid-phase extraction urban wastewater by and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry*, **73**: 3632-3638.
- Gomez-Rico MF, Font R, Vera J, Fuentes D, Disante K y Cortina J (2008) Degradation of organic pollutants in Mediterranean forest soils amended with sewage sludge. *Chemosphere*, **71**: 2129-2138.
- Gonzalez JM, Zimmermann J y Saiz-Jimenez C (2005) Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. *Bioinformatics*, **21**: 333-337.
- Gotelli NJ y Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, **4**: 379-391.

- Goto DK y Yan T (2011) Genotypic diversity of *Escherichia coli* in the water and soil of tropical watersheds in Hawaii. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 3988-3997.
- Granli T y Bockman OC (1994) Nitrous oxide from agriculture. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences Supplement*, **0**: 1-128.
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG y Bailey MJ (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 5488-5491.
- Grogan P, Baar J y Bruns TD (2000) Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *Journal of Ecology*, **88**: 1051-1062.
- Grøn C, Von Arnold K y Laturnus F (2007) Organic contaminants from sewage sludge applied to agricultural soils. False alarm regarding possible problems for food safety? *Environmental Science and Pollution Research*, **14**: 53-60.
- Guardabassi L y Agero Y (2006) Genes homologous to glycopeptide resistance vanA are widespread in soil microbial communities. *FEMS Microbiol Lett*, **259**: 221-225.
- Guerrero C, Gómez I, Moral R, Mataix-Solera J, Mataix-Beneyto J y Hernández T (2001) Reclamation of a burned forest soil with municipal waste compost: macronutrient dynamic and improved vegetation cover recovery. *Bioresour Technol*, **76**: 221-227.
- Han G, Zhou G, Xu Z, Yang Y, Liu J y Shi K (2007) Biotic and abiotic factors controlling the spatial and temporal variation of soil respiration in an agricultural ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**: 418-425.
- Hargreaves JC, Adl MS y Warman PR (2008) A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **123**: 1-14.
- Hart SC, DeLuca TH, Newman GS, MacKenzie MD y Boyle SI (2005) Post-fire vegetative dynamics as drivers of microbial community structure and function in forest soils. *Forest Ecology and Management*, **220**: 166-184.
- Hartmann M y Widmer F (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 7804-7812.
- He Z, Piceno Y, Deng Y, Xu M, Lu Z, Desantis T, Andersen G, Hobbie SE, Reich PB y Zhou J (2012) The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME journal*, **6**: 259-272.
- Hemmat A, Aghilinategh N, Rezainejad Y y Sadeghi M (2010) Long-term impacts of municipal solid waste compost, sewage sludge and farmyard manure application on organic carbon, bulk density and consistency limits of a calcareous soil in central Iran. *Soil & Tillage Research*, **108**: 43-50.
- Heuer H y Smalla K (2007) Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ Microbiol*, **9**: 657-666.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Mi-àdlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker

- C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ y Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, **111**: 509-547.
- Holzel CS, Muller C, Harms KS, Mikolajewski S, Schafer S, Schwaiger K y Bauer J (2012) Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, **113**: 21-27.
- Hölzel CS, Schwaiger K, Harms K, Küchenhoff H, Kunz A, Meyer K, Müller C y Bauer J (2010) Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environmental Research*, **110**: 318-326.
- Hu SJ, van Bruggen AHC y Grünwald NJ (1999) Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Applied Soil Ecology*, **13**: 21-30.
- Huber T, Faulkner G y Hugenholtz P (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, **20**: 2317-2319.
- Hueso S, Hernandez T y Garcia C (2011) Resistance and resilience of the soil microbial biomass to severe drought in semiarid soils: The importance of organic amendments. *Applied Soil Ecology*, **50**: 27-36.
- Hunter P (2008) Natural solutions to climate change. *EMBO Rep*, **9**: 508-511.
- Insam H y Wett B (2008) Control of GHG emission at the microbial community level. *Waste Management*, **28**: 699-706.
- Iovieno P, Morra L, Leone A, Pagano L y Alfani A (2009) Effect of organic and mineral fertilizers on soil respiration and enzyme activities of two Mediterranean horticultural soils. *Biology and Fertility of Soils*, **45**: 555-561.
- Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE y Sadowsky MJ (2006) Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from lake superior watersheds. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 612-621.
- IUSS Working Group WRB (2007). *World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication*. FAO (Ed.) Rome, Italy.
- Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Sanderlin JS, Reeves JH, Jenkins MB, Endale DM, Coleman DC y Whitman WB (2008) Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 2843-2853.
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 1719-1728.
- Jezierska-Tys S y Frac M (2008) Microbiological indices of soil quality fertilized with dairy sewage sludge. *International Agrophysics*, **22**: 215-219.
- Jezierska-Tys S, Frac M y Tys J (2010) Microbiological hazards resulting from application of dairy sewage sludge: effects on occurrence of pathogenic microorganisms in soil. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*, **73**: 1194-1201.
- Jhonson C (2009). *Biology of soil science*. Oxford Book Company, Jaipur, India.
- Joniec J y Furezak J (2008) Counts and activity of microorganisms participating in nitrogen transformations in soil, four years after application of sewage sludge. *Journal of Elementology*, **13**: 545-557.
- Juárez-Rodríguez J, Fernández-Luqueño F, Conde E, Reyes-Varela V, Cervantes-Santiago F, Botello-Alvarez E, Cárdenas-Manríquez M y Dendooven L (2012) Greenhouse gas emissions from an alkaline saline soil cultivated with maize (*Zea Mays* L.) and amended with

- anaerobically digested cow manure: a greenhouse experiment. *Journal of Plant Nutrition*, **35**: 511-523.
- Kacprzak M y Stanczyk-Mazanek E (2003) Changes in the structure of fungal communities of soil treated with sewage sludge. *Biology and Fertility of Soils*, **38**: 89-95.
- Karpowicz E, Novinscak A, Barlocher F y Filion M (2009) qPCR quantification and genetic characterization of *Clostridium perfringens* populations in biosolids composted for 2 years. *J Appl Microbiol*, **108**: 571-578.
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, **8**: 1-13.
- Kerstens K, Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, y Stackebrandt E (2006). Introduction to the *Proteobacteria*. En Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., and Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, USA, pp. 3-37.
- Kielak A, Pijl AS, van Veen JA y Kowalchuk GA (2008) Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FEMS Microbiol Ecol*, **63**: 372-382.
- Kielak A, Pijl AS, van Veen JA y Kowalchuk GA (2009) Phylogenetic diversity of *Acidobacteria* in a former agricultural soil. *ISME J*, **3**: 378-382.
- Killham K y Prosser JI (2007). The prokaryotes. En Paul, E.A. (Ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Kim JS, Dungan RS y Crowley D (2008) Microarray analysis of bacterial diversity and distribution in aggregates from a desert agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, **44**: 1003-1011.
- Kirchman DL (2002) The ecology of *Cytophaga Flavobacteria* in aquatic environments. *Fems Microbiology Ecology*, **39**: 91-100.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglou P, Klironomos JN, Lee H y Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, **58**: 169-188.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB y Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol*, **36**: 1202-1211.
- Koneman E y Allen S (2008). *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Kümmerer K (2001). *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer, Michigan, USA.
- Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 5-7.
- Kümmerer K (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **54**: 311-320.
- Kümmerer K (2008). *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer, Heidelberg, Germany.
- Kuntz J, Nassr-Amellal N, Lollier M, Schmidt JE y Lebeau T (2008) Effect of sludges on bacteria in agricultural soil. Analysis at laboratory and outdoor lysimeter scale. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**: 277-288.



- Kuramae EE, Yergeau E, Wong LC, Pijl AS, van Veen JA y Kowalchuk GA (2012) Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *Fems Microbiology Ecology*, **79**: 12-24.
- Kuramae EE, Gamper HA, Yergeau E, Piceno YM, Brodie EL, DeSantis TZ, Andersen GL, van Veen JA y Kowalchuk GA (2010) Microbial secondary succession in a chronosequence of chalk grasslands. *ISME J*, **4**: 711-715.
- Kuske CR, Barns SM y Busch JD (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 3614-3621.
- Lal R (2007) Carbon management in agricultural soils. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **12**: 303-322.
- Lambais MR y do Carmo JB (2008) Impacts of biosolids amendments on the microbiota of tropical soils. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, **32**: 1129-1138.
- Lang NL y Smith SR (2007) Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *J Appl Microbiol*, **103**: 2122-2131.
- Larchevêque M, Montès N, Baldy V y Dupouyet S (2005) Vegetation dynamics after compost amendment in a Mediterranean post-fire ecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **110**: 241-248.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R y Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 5111-5120.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA y Fierer N (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 2407-2415.
- Lavelle P y Spain AV (2003). *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, New York, USA.
- Lawlor K, Knight BP, Barbosa-Jefferson VL, Lane PW, Lilley AK, Paton GI, McGrath SP, O'Flaherty SM y Hirsch PR (2000) Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. *Fems Microbiology Ecology*, **33**: 129-137.
- Lemunier M, Francou C, Rousseaux S, Houot S, Dantigny P, Piveteau P y Guzzo J (2005) Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 5779-5786.
- Levy SB (2002a) Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*, **92**: 65S-71S.
- Levy SB (2002b). *The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers*. Harper Collins Publishers, Cambridge, UK.
- Li F, Liang W, Zhang X, Jiang Y y Wang J (2008) Changes in soil microbial biomass and bacterial community in a long-term fertilization experiment during the growth of maize. *Advances in Environmental Biology*, **2**: 1-8.
- Liang B, Lehmann J, Solomon D, Kinyangi J, Grossman J, O'Neill B, Skjemstad JO, Thies J, Luizao FJ, Petersen J y Neves EG (2006) Black Carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci Soc Am J*, **70**: 1719-1730.

- Liu P, Soupier ML, Zwonitzer M, Huss B y Jarboe LR (2011a) Association of antibiotic resistance in agricultural *Escherichia coli* isolates with attachment to quartz. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 6945-6953.
- Liu S, Zhu N, Li LY y Yuan H (2011b) Isolation, identification and utilization of thermophilic strains in aerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, **45**: 5959-5968.
- Liu W, Luo Y, Teng Y, Li Z y Ma L (2010) Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environmental Geochemistry and Health*, **32**: 23-29.
- Luo Y y Zhou X (2006a). Responses to disturbances. En Academic Press (Ed.), *Soil Respiration and Environment*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 134-156.
- Luo Y y Zhou X (2006b). *Soil respiration and the environment*. Elsevier Academic Press, USA.
- Luo Y y Zhou X (2006c). Temporal and spatial variations in soil respiration. En Academic Press (Ed.), *Soil Respiration and Environment*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 108-130.
- Lynch JM y Hobbie JE (1988). *Micro-organisms in action: concepts and applications in Microbial Ecology*. Blackwell Scientific Publications, Boston, USA.
- Mäeder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P y Niggli U (2002) Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, **296**: 1694-1697.
- Magurran AE (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princenton University Press (Ed.) Croom Helm, New Jersey, USA.
- Maidak BL, Cole JR, Parker CT, Garrity GM, Larsen N, Li B, Lilburn TG, McCaughey MJ, Olsen GJ, Overbeek R, Pramanik S, Schmidt TM, Tiedje JM y Woese CR (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucl Acids Res*, **27**: 171-173.
- Maier RM, Pepper IL y Gerba CP (2009). *Environmental microbiology*. Academic Press, Elsevier, Oxford, UK.
- Mantovi P, Baldoni G y Toderi G (2005) Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Res*, **39**: 289-296.
- Marmo L (2008) EU strategies and policies on soil and waste management to offset greenhouse gas emissions. *Waste Management*, **28**: 685-689.
- Marschner P, Kandeler E y Marschner B (2003) Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**: 453-461.
- Martínez F, Cuevas G, Calvo R y Walter I (2003) Biowaste effects on soil and native plants in a semiarid ecosystem. *J Environ Qual*, **32**: 472-479.
- Martínez JL, Sánchez MB, Martínez-Solano L, Hernández A, Garmendia L, Fajardo A y Álvarez-Ortega C (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, **33**: 430-449.
- Martinez S, Lopez M y Bernardo A (2003) Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol*, **37**: 475-481.
- Matches JR, Liston J y Curran D (1974) *Clostridium perfringens* in the environment. *Appl Microbiol*, **28**: 655-660.
- Mattana S, Ortiz O y Alcaniz J (2010) Substrate-induced respiration of a sandy soil treated with different types of organic waste. *Commun Soil Sci Plant Anal*, **41**: 408-423.

- McCaig AE, Glover LA y Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 1721-1730.
- McLaughlin A y Mineau P (1995) The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **55**: 201-212.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW y Vilgalys R (2009) The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*, **17**: 488-497.
- Mendez MO, Neilson JW y Maier RM (2008) Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 3899-3907.
- Minz D, Karyo R, y Gerstl Z (2011). Effects of treated municipal wastewater irrigation on soil microbiology. En Levy,G., Fine,P., and Bart-Tal,A. (Eds.), *Treated wastewater in agriculture: use and impacts on the soil environments and crops*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Mishra A y Nautiyal CS (2009) Functional diversity of the microbial community in the rhizosphere of chickpea grown in diesel fuel-spiked soil amended with *Trichoderma reesei* using sole-carbon-source utilization profiles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **25**: 1175-1180.
- Miura Y, Watanabe Y y Okabe S (2007) Significance of *Chloroflexi* in performance of submerged membrane bioreactors (MBR) treating municipal wastewater. *Environ Sci Technol*, **41**: 7787-7794.
- Mølbak K (2004) Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **51**: 364-369.
- Mondini C y Sequi P (2008) Implication of soil C sequestration on sustainable agriculture and environment. *Waste Management*, **28**: 678-684.
- Monier JM, Demaneche S, Delmont TO, Mathieu A, Vogel TM y Simonet P (2011) Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Curr Opin Microbiol*, **14**: 229-235.
- Mosier AR (1998) Soil processes and global change. *Biology and Fertility of Soils*, **27**: 221-229.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S y Sørensen SJ (2001) The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *Fems Microbiology Ecology*, **36**: 11-19.
- Munir M, Wong K y Xagoraki I (2011) Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, **45**: 681-693.
- Munir M y Xagoraki I (2011) Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil. *J Environ Qual*, **40**: 248-255.
- Mustea I y Muresian T (1967) Crabtree effect in some bacterial cultures. *Cancer*, **20**: 1499-1501.
- Nakatani AS, Martines AM, Nogueira MA, Fagotti DSL, Oliveira AG, Bini D, Sousa JP y Cardoso EJBN (2011) Changes in the genetic structure of bacteria and microbial activity in an agricultural soil amended with tannery sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**: 106-114.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G y Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, **54**: 655-670.
- Nemergut DR, Townsend AR, Sattin SR, Freeman KR, Fierer N, Neff JC, Bowman WD, Schadt CW, Weintraub MN y Schmidt SK (2008) The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, **10**: 3093-3105.

- Nieder R y Benbi DK (2008). Bidirectional biosphere-atmosphere interactions. *Carbon and nitrogen in the terrestrial environment*. Springer, Netherlands, pp. 235-305.
- Niederberger TD, McDonald IR, Hacker AL, Soo RM, Barrett JE, Wall DH y Cary SC (2008) Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica. *Environmental Microbiology*, **10**: 1713-1724.
- Nielsen MN y Winding A (2002). *Microorganisms as indicators of soil health*. Ministry of the Environment NERI (Ed.) Denmark.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**: 313-339.
- O'Connor GA, Elliott HA, Basta NT, Bastian RK, Pierzynski GM, Sims RC y Smith JE, Jr. (2005) Sustainable land application: an overview. *J Environ Qual*, **34**: 7-17.
- Ochoa-Hueso R, Allen EB, Branquinho C, Cruz C, Dias T, Fenn ME, Manrique E, Perez-Corona ME, SHEPPARD LJ y Stock WD (2011) Nitrogen deposition effects on Mediterranean-type ecosystems: An ecological assessment. *Environmental Pollution*, **159**: 2265-2279.
- Odlare M, Pell M y Svensson K (2008) Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste Management*, **28**: 1246-1253.
- Ohtonen R, Lähdesmäki P y Markkola AM (1994) Cellulase activity in forest humus along an industrial pollution gradient in Oulu, Northern Finland. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**: 97-101.
- Or D, Smets BF, Wraith JM, Dechesne A y Friedman SP (2007) Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Advances in Water Resources*, **30**: 1505-1527.
- Orsini M y Romano-Spica V (2001) A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Lett Appl Microbiol*, **33**: 17-20.
- Øvreås L y Torsvik V (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, **36**: 303-315.
- Paetz A y Wilke B-M (2005). Soil sampling and storage. En Margesin, R. and Schinner, F. (Eds.), *Manual for soil analysis: monitoring and assessing soil bioremediation*. Springer, Berlin, Germany, pp. 1-45.
- Pan X, Qiang Z, Ben W y Chen M (2011) Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere*, **84**: 695-700.
- Pankhurst CE, Ophel-Keller K, Doube BM y Gupta VVSR (1996) Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodiversity and Conservation*, **5**: 197-209.
- Paramasivam S, Fortenberry GZ, Julius A, Sajwan KS y Alva A (2008) Evaluation of emission of greenhouse gases from soils amended with sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **43**: 178-185.
- Pascual I, Antolín MC, García C, Polo A y Sánchez-Díaz M (2007) Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. *Bioresour Technol*, **98**: 29-37.
- Paul EA (2007). *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Academic Press, USA.

- Pepper IL y Gerba CP (2005). *Environmental microbiology: a laboratory manual*. Elsevier Academic Press, London, USA.
- Pepper IL, Zerzghi H, Brooks JP y Gerba CP (2008) Sustainability of land application of Class B biosolids. *J Environ Qual*, **37**: S58-S67.
- Pérez-de-Mora A, Burgos P, Madejón E, Cabrera F, Jaekel P y Schloter M (2006) Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**: 327-341.
- Pérez-Piqueres A, Edel-Hermann V, Alabouvette C y Steinberg C (2006) Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**: 460-470.
- Perucci P (1992) Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*, **14**: 54-60.
- Peterjohn WT, Melillo JM, Steudler PA, Newkirk KM, Bowles FP y Aber JD (1994) Responses of trace gas fluxes and N availability to experimentally elevated soil temperatures. *Ecological Applications*, **4**: 617-625.
- Petersen SO, Henriksen K, Mortensen GK, Krogh PH, Brandt KK, Sørensen J, Madsen T, Petersen J y Grøn C (2003) Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil and Tillage Research*, **72**: 139-152.
- Popowska M, Miernik A, Rzezzycka M y Lopaciuk A (2010) The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria. *J Environ Qual*, **39**: 1679-1687.
- Poulsen PHB, Al-Soud WA, Bergmark L, Magid J, Hansen LH y Sørensen SJ (2012) Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial – Prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Pronk JT, Steensma HY y vanDijken JP (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**: 1607-1633.
- Prosser JI. Relationships between microbial diversity and organic matter transformations: more species than we need. Organic matter stabilization and ecosystem functions. Proceedings of SOM.Organic matter stabilization and ecosystem functions. 83. 2010. ADEME.  
Ref Type: Conference Proceeding
- Prosser JI, Bohannan BJM, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green LE, Killham K, Lennon JJ, Osborn AM, Solan M, van der Gast CJ y Young JP (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Micro*, **5**: 384-392.
- Rauch W y Becker W (2000) Waste sludge disposal in extreme alpine environments. *Waste Management and Research*, **18**: 33-40.
- Reasoner DJ (2004) Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, **92**: 307-315.
- Rees RM, Ball BC, Campbell CD y Watson CA (2001). *Sustainable management of soil organic matter*. Rees RM, Ball BC, Campbell CD y Watson CA (Eds.) CABI Pub., New York, USA.
- Reinthal FF, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckebauer G, Mascher F y Marth E (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, **37**: 1685-1690.

- Richardson ML y Bowron JM (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **37**: 1-12.
- Riesenfeld CS, Goodman RM y Handelsman J (2004) Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol*, **6**: 981-989.
- Rillig MC y Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**: 41-53.
- Rivière D, Desvignes V, Pelletier E, Chaussonnerie S, Guermazi S, Weissenbach J, Li T, Camacho P y Sghir A (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J*, **3**: 700-714.
- Rocha UN, Andreote F, Azevedo JL, van Elsas J y van Overbeek L (2010) Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments*, **10**: 326-339.
- Rodrigues F, Ludovico P, y Leão C (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. En Péter,G. and Rosa,C. (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 101-121.
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG y Triplett EW (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*, **1**: 283-290.
- Ros M, Knapp BA, Peintner U y Insam H (2011) Short communication. Response of bacterial community composition to long-term applications of different composts in agricultural soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **9**: 338-343.
- Ros M, Pascual JA, Garcia C, Hernandez MT y Insam H (2006) Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biol Biochem*, **38**: 3443-3452.
- Ros M, Rodríguez I, García C y Hernández T (2010) Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresour Technol*, **101**: 6916-6923.
- Ros M, Hernández MT y García C (2003) Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**: 463-469.
- Rousk J, Demoling LA y Baath E (2009a) Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria. *Microb Ecol*, **58**: 75-85.
- Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R y Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J*, **4**: 1340-1351.
- Rousk J, Brookes PC y Baath E (2009b) Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 1589-1596.
- Rudolph B, Gebendorfer KM, Buchner J y Winter J (2010) Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, **285**: 19029-19034.
- Sacher F, Lang FT, Brauch HJ y Blankenhorn I (2001) Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, **938**: 199-210.

- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V y Quackenbush J (2003) TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, **34**: 374-378.
- Saison C, Degrange V, Oliver R, Millard P, Commeaux C, Montange D y Le Roux X (2006) Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology*, **8**: 247-257.
- Sait M, Davis KER y Janssen PH (2006) Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 1852-1857.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sambrook J y Russell DW (2006). The Inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: "Ultra-competent" cells. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, pp. 1.112-1.115.
- Sardans J, Penuelas J y Estiarte M (2006) Warming and drought alter soil phosphatase activity and soil P availability in a Mediterranean shrubland. *Plant Soil*, **289**: 227-238.
- Sarmah AK, Meyer MT y Boxall ABA (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65**: 725-759.
- Schimel J, Balser TC y Wallenstein M (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, **88**: 1386-1394.
- Schloss PD y Handelsman J (2006) Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol*, **2**: 786-793.
- Schlötelburg C, von Wintzingerode F, Hauck R, Hegemann W y Gobel UB (2000) Bacteria of an anaerobic 1,2-dichloropropane-dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50**: 1505-1511.
- Schmitt H, Stoob K, Hamscher G, Smit E y Seinen W (2006) Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microbial Ecology*, **51**: 267-276.
- Secretaría de Estado de Cambio Climático (2009) Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR) 2007-2015. *BOE*, **49**: 19893-20016.
- Sengupta N, Alam SI, Kumar RB y Singh L (2011) Diversity and antibiotic susceptibility pattern of cultivable anaerobic bacteria from soil and sewage samples of India. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**: 64-77.
- Seveno NA, Kallifidas D, Smalla K, van Elsas JD, Collard JM, Karagouni AD y Wellington EMH (2002) Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Reviews in Medical Microbiology*, **13**: 15-27.
- Sherameti I y Varma A (2009). *Soil heavy metals*. Springer, New York, USA.
- Silbergeld EK, Graham J y Price LB (2008). *Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health*. Annual Review of Public Health, Palo Alto, CA, USA.

- Simberloff D (1978). Use of rarefaction and related methods in ecology. *Biological data in water pollution assessment: quantitative and statistical analyses: a symposium*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp. 150-165.
- Singer RS, Ward MP y Maldonado G (2006) Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? *Nature Reviews Microbiology*, **4**: 943-952.
- Singh RP y Agrawal M (2008) Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, **28**: 347-358.
- Six J, Frey SD, Thiet RK y Batten KM (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sci Soc Am J*, **70**: 555-569.
- Smalla K, Heuer H, Gotz A, Niemeyer D, Krogerrecklenfort E y Tietze E (2000) Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 4854-4862.
- Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S y Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 2284-2291.
- Smith P (2004) Carbon sequestration in croplands: the potential in Europe and the global context. *European Journal of Agronomy*, **20**: 229-236.
- Smith P, Powlson DS, Smith JU, Falloon P y Coleman K (2000) Meeting Europe's climate change commitments: quantitative estimates of the potential for carbon mitigation by agriculture. *Global Change Biology*, **6**: 525-539.
- Smith SR (2009) Organic contaminants in sewage sludge (biosolids) and their significance for agricultural recycling. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **367**: 4005-4041.
- Sombroek WG, Nachtergaele FO y Hebel A (1993) Amounts, Dynamics and Sequestering of Carbon in Tropical and Subtropical Soils. *Ambio*, **22**: 417-426.
- Spain AM, Krumholz LR y Elshahed MS (2009) Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *ISME J*, **3**: 992-1000.
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM y Breznak JA (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 4748-4755.
- Subbiah M, Mitchell SM, Ullman JL y Call DR (2011)  $\beta$ -Lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin, and tetracycline are neutralized. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 7255-7260.
- Sun HY, Deng SP y Raun WR (2004) Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 5868-5874.
- Sun YH, Luo YM, Wu LH, Li ZG, Song J y Christie P (2006) Survival of faecal coliforms and hygiene risks in soils treated with municipal sewage sludges. *Environ Geochem Health*, **28**: 97-101.
- Sylvia DM (2005). *Principles and applications of soil microbiology*. Pearson Prentice Hall (Ed.) Pearson Prentice Hall, New Jersey, NY, USA.
- Tabacchioni S, Chiarini L, Bevivino A, Cantale C y Dalmastri C (2000) Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecology*, **40**: 169-176.



- Tarrasón D, Ojeda G, Ortiz O y Alcañiz JM (2010) Effects of Different Types of Sludge on Soil Microbial Properties: A Field Experiment on Degraded Mediterranean Soils. *Pedosphere*, **20**: 681-691.
- Tchobanoglous G, Burton FL, Metcalf & Eddy y Stensel HD (2004). *Wastewater engineering: treatment and reuse*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Tejada M, Gonzalez JL, Hernandez MT y Garcia C (2008) Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: Effect on soil microbial properties. *Bioresour Technol*, **99**: 2872-2880.
- Tejada M, Hernandez MT y Garcia C (2009) Soil restoration using composted plant residues: effects on soil properties. *Soil and Tillage Research*, **102**: 109-117.
- Thierie J y Penninckx MJ (2004) Possible occurrence of a crabtree effect in the production of lactic and butyric acids by a floc-forming bacterial consortium. *Curr Microbiol*, **48**: 224-229.
- Thorn RG y Lynch MD (2007). Fungi and eukaryotic algae. En Paul, E.A. (Ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Elsevier, Oxford, UK, pp. 145-162.
- Tolls J (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ Sci Technol*, **35**: 3397-3406.
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA y Ovreas L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, **64**: 53-62.
- Torsvik V y Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, **5**: 240-245.
- Torsvik V, Øvreås L y Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity. Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, **296**: 1064-1066.
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, Podar M, Short JM, Mathur EJ, Detter JC, Bork P, Hugenholtz P y Rubin EM (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, **308**: 554-557.
- Turovskiy S y Mathai P (2006). *Wastewater sludge processing*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, USA.
- United States Environmental Protection Agency (1995). *Land application of sewage sludge and domestic septage: process design manual*. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development National Risk Management Research Laboratory Center for Environmental Research Information (Ed.) Cincinnati, OH, USA.
- Upchurch R, Chiu CY, Everett K, Dyszynski G, Coleman DC y Whitman WB (2008) Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 1294-1305.
- Val-Moraes S, Marcondes J, Carareto Alves L y Lemos E (2011) Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**: 1-7.
- van Elsas JD y Smalla K (1997). Methods for sampling soil microbes. AMS Press, Washington D.C., USA, pp. 383-390.
- Villar MC, Petrikova V, Díaz-Raviña M y Carballas T (2004) Changes in soil microbial biomass and aggregate stability following burning and soil rehabilitation. *Geoderma*, **122**: 73-82.
- Voroney RP (2007). The soil habitat. En Paul, E.A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Academic Press, Elsevier, Oxford, UK, pp. 25-49.

- Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N y Daims H (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 665-680.
- Wakelin S, Chu G, Broos K, Clarke K, Liang Y y McLaughlin M (2010) Structural and functional response of soil microbiota to addition of plant substrate are moderated by soil Cu levels. *Biology and Fertility of Soils*, **46**: 333-342.
- Wallace BM, Krzic M, Forge TA, Broersma K y Newman RF (2009) Biosolids increase soil aggregation and protection of soil carbon five years after application on a crested wheatgrass pasture. *J Environ Qual*, **38**: 291-298.
- Wang H, Brown SL, Magesan GN, Slade AH, Quintern M, Clinton PW y Payn TW (2008) Technological options for the management of biosolids. *Environ Sci Pollut Res Int*, **15**: 308-317.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM y Cole JR (2007) Naive Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, **73**: 5261-5267.
- Ward DM, Weller R y Bateson MM (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, **345**: 63-65.
- Wellington EMH y Elsas JD (1992). *Genetic interactions among microorganisms in the natural environment*. Pergamon Press, Michigan, USA.
- Wessen E, Nyberg K, Jansson JK y Hallin S (2010) Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology*, **45**: 193-200.
- Whalen JK y Sampedro L (2010). *Soil ecology and management*. CABI, Cambridge, UK.
- White RE (2006). *Principles and practice of soil science: the soil as a natural resource*. Wiley-Blackwell (Ed.) Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Wolfe AJ (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**: 12-50.
- Wolna-Maruwka A, Klama J y Niewiadomska A (2007) Effect of fertilization using communal sewage sludge on respiration activity and counts of selected microorganisms in the grey brown podzolic soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, **16**: 899-907.
- Wright GD (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol*, **13**: 589-594.
- Xiong J, Wu L, Tu S, Van Nostrand JD, He Z, Zhou J y Wang G (2010) Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and the rhizosphere of the arsenic-hyperaccumulating plant *Pteris vittata* L. *Appl Environ Microbiol*, **76**: 7277-7284.
- Young IM y Crawford JW (2004) Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, **304**: 1634-1637.
- Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najar FZ, Roe BA y Elshahed MS (2009) Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 5227-5236.
- Youssef NH y Elshahed MS (2009) Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *Isme Journal*, **3**: 305-313.

- Zerzghi H, Gerba CP, Brooks JP y Pepper IL (2010) Long-term effects of land application of Class B biosolids on the soil microbial populations, pathogens, and activity. *J Environ Qual*, **39**: 402-408.
- Zhang L y Xu ZH (2008) Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*, **8**: 379-388.
- Zhang X, Lin F, Wong M, Feng X y Wang K (2009) Identification of soil heavy metal sources from anthropogenic activities and pollution assessment of Fuyang County, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, **154**: 439-449.
- Zogg GP, Zak DR, Ringelberg DB, MacDonald NW, Pregitzer KS y White DC (1997) Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci Soc Am J*, **61**: 475-481.
- Zuccato E, Calamari D, Natangelo M y Fanelli R (2000) Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*, **355**: 1789-1790.